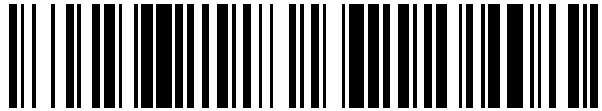


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 466 716**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2003 E 10183379 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 2316852**

54 Título: **Anticuerpos de un solo dominio estabilizados**

30 Prioridad:

08.11.2002 US 425073 P
08.11.2002 US 425063 P
10.01.2003 EP 03447005
23.06.2003 WO PCT/EP03/06581
08.07.2003 WO PCT/EP03/07313

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.06.2014

73 Titular/es:

ABLYNX N.V. (100.0%)
Technologiepark 21
9052 Ghent-Zwijnaarde, BE

72 Inventor/es:

SILENCE, KAREN;
LAUWEREYS, MARC y
DREIER, TORSTEN

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 466 716 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos de un solo dominio estabilizados

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona constructos polipeptídicos heteroespecíficos que comprenden uno o más anticuerpos de un solo dominio tal como se definen en las reivindicaciones, teniendo dichos constructos estabilidad *in vivo* mejorada, y su uso en diagnóstico y terapia.

10

Antecedentes de la invención

Los agentes terapéuticos polipeptídicos y en particular los agentes terapéuticos basados en anticuerpos tienen un potencial significativo como fármacos puesto que tienen una especificidad exquisita para su diana y una baja toxicidad inherente. Sin embargo, para ser eficaces como agente terapéutico, debe optimizarse su perfil farmacocinético. La mayoría de las aplicaciones de anticuerpos actuales son para trastornos agudos. Sin embargo, existen oportunidades significativas para desarrollar agentes terapéuticos de anticuerpos para estados crónicos. Esto requerirá grandes dosis de proteína a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. Puesto que el coste de la producción de anticuerpos en células de mamíferos es alto, se ha desistido del desarrollo de agentes terapéuticos de anticuerpos tradicionales para estas aplicaciones. Un enfoque alternativo ha sido expresar fragmentos de anticuerpos tales como Fab o Fv de cadena sencilla en sistemas de expresión microbianos tales como de levaduras y bacterias. Sin embargo, estos fragmentos tienen tiempos de circulación muy cortos *in vivo*.

15

20

25

30

Algunos de los enfoques iniciales para aumentar la circulación en el torrente sanguíneo de proteínas y péptidos se basaron en modificación química, tal como pegilación (documento US 4.179.337). Ejemplos de tales productos son PEG-intron, es decir, interferón alfa-2b pegilado para el tratamiento de VHC, y el tratamiento de un trastorno crónico con anticuerpos modificados con PEG (A.P Chapman, Adv. Drug Delivery Reviews (2002), 54, 531-545). Sin embargo, tales métodos químicos presentan varias desventajas, tales como inactivación de la proteína o el péptido diana debido a la modificación química de determinadas cadenas laterales de aminoácidos, inestabilidad de la proteína/del péptido diana durante la reacción química.

35

40

45

Para superar estas limitaciones, se han desarrollado enfoques alternativos, en primer lugar usando proteínas no convencionales o modificaciones, en segundo lugar usando métodos alternativos para aumentar la semivida *in vivo*. Por tanto, puede llevarse a cabo la estabilización del fármaco proteico eligiendo un andamiaje proteico inherentemente estable y proporcionando métodos para unir tal andamiaje a proteínas plasmáticas que aparecen a altas concentraciones, tales como inmunoglobulinas o albúmina. La unión a una proteína plasmática puede ser un medio eficaz para mejorar las propiedades farmacocinéticas de moléculas en general. De manera más precisa, se ha descrito la unión a albúmina para mejorar la semivida de proteínas: M.S. Dennis *et al.* (J. Biol. Chem. 33, 2383-90, 2002) aislaron péptidos que tenían afinidad por albúmina sérica. Cuando se unen a una molécula de Fab, se obtuvieron semividas comparables a Fab pegilados. Se han dado a conocer ligandos peptídicos que tienen afinidad por IgG o albúmina sérica (documento WO 01/45746). Cemü Bioteknik (Nygren, Wigzell, Uhlen, documentos EP 486525 B1; US 6.267.964) descubrieron fusiones de proteínas o péptidos activos frente a polipéptidos de origen bacteriano que se unen a albúmina sérica (por ejemplo, estaf. A). El inconveniente de estos enfoques basados en péptidos es que los péptidos tienen que plegarse de manera apropiada y ser accesibles para la unión a albúmina sérica cuando se fusionan a la proteína terapéutica. Por tanto, estos péptidos son inherentemente inestables y tienen afinidades en el rango submicromolar en vez del rango subnanomolar o nanomolar bajo, como es el caso con anticuerpos convencionales. Como parte de una proteína más grande, tal como una molécula de anticuerpo convencional, la unión de estos péptidos a albúmina puede estar impedida estéricamente.

50

55

60

65

Una molécula híbrida alternativa con dos unidades funcionales se basa en un anticuerpo heteroespecífico. Un híbrido de este tipo consistirá en un constructo de anticuerpo bifuncional o heteroespecífico con una entidad que tiene especificidad y afinidad por la diana, teniendo la segunda entidad especificidad y afinidad por una proteína sérica, tal como albúmina. Sin embargo, tales constructos heteroespecíficos basados en anticuerpos o fragmentos Fab convencionales tienen varios inconvenientes importantes: son grandes moléculas complejas compuestas por dos cadenas polipeptídicas (VH y VL) y por tanto son difíciles y caros de producir en grandes cantidades en sistemas de expresión de mamíferos. Además, producir anticuerpos bifuncionales compuestos por 4 cadenas (2 VH y 2 VL) tiene el riesgo inherente de dar como resultado moléculas con las combinaciones VH-VL improductivas y la consiguiente pérdida de actividad. Se han intentado varias alternativas con resultados dispares basándose en derivados peptídicos de anticuerpos convencionales, tales como diacuerpos y scFv bifuncionales (documentos WO0220615; WO9413804; WO9119739; WO9409131). Holliger *et al.* (Nature Biotech. 15, 632-636, 1997) sugieren que la unión de uno de los fragmentos de anticuerpo de un diacuerpo (constructo biespecífico derivado de un anticuerpo convencional) a inmunoglobulina sérica (IgG) puede prolongar el tiempo de permanencia en suero de tales diacuerpos pero no se realiza ninguna sugerencia de que puedan estabilizarse diacuerpos biespecíficos usando anticuerpos contra una proteína sérica distinta de la IgG sérica. Se sabe que los diacuerpos son inherentemente difíciles de producir debido a la pegajosidad de su superficie expuesta y debido a asociaciones no productivas entre las cuatro regiones V diferentes (2 VH + 2 VL).

La unión covalente a proteínas séricas tal como se da a conocer, por ejemplo, en los documentos EP0793506B1, US 5.612.034, 6.103.233 y US20020003441, usando grupos reactivos que forman enlaces covalentes estables a una proteína sérica o a una célula, tienen la desventaja inherente de la modificación no deseada de la diana a través de los grupos reactivos.

5 Se han descrito fusiones a grandes proteínas de larga vida tales como albúmina (Syed *et al*, Blood 89, 3243-3252 (1997), Yen *et al*, PNAS 89, 1904-1908 (1992); Celltech (documento WO0027435)) o fusiones N-terminales de polipéptidos de albúmina (Delta Biotech/HGS, documentos US 5.380.712, US 5.766.883) o la parte Fc de IgG (Capon *et al*, Nature 337, 59-5-531(1989); Ashkenazi *et al*, Curr. Op. Immunol. 9, 195-200 (1997)). Tales fusiones
10 tienen la desventaja de una producción ineficaz y de producir reacciones inmunológicas no deseadas.

Muyldermans, Rev. Mol. Biotechnol., 2001, 74, 277-302 describe constructos de unión a antígeno bivalentes y biespecíficos paramados a partir de dominios VHH.

15 Smith *et al.*, Bioconjugate Chem. 2001, 12 750-756 describen F(ab')₂ biespecíficos con especificidad por albúmina sérica de rata que tiene un mayor área bajo la curva en comparación con un F(ab')₂ sin especificidad frente a albúmina.

20 El documento EP 0 368 684 A1 describe que un segundo sitio de unión para un componente sérico prolongaría la función efectora de un ligando de un solo dominio.

En el documento US 5.055.289 se ha descrito un complejo de interferón con un anticuerpo monoclonal para aumentar la semivida sérica de interferón. Tal enfoque tiene el riesgo inherente de afectar la actividad biológica del interferón puesto que el tamaño del constructo plantea el problema del impedimento estérico.

25 **Los objetivos de la presente invención**

Un objetivo de la presente invención es proporcionar constructos polipeptídicos de anticuerpos heteroespecíficos terapéuticos que superen los problemas de los anticuerpos terapéuticos de la técnica, concretamente, baja semivida *in vivo*, mal plegamiento, baja expresión y escasa estabilidad. Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar métodos para proporcionar dichos anticuerpos heteroespecíficos.

30 **Sumario de la invención**

35 Una realización de la presente invención es un constructo polipeptídico que comprende:

- al menos un anticuerpo de un solo dominio dirigido contra una diana terapéutica y/o de diagnóstico, y
- al menos un anticuerpo de un solo dominio dirigido contra una proteína sérica, tal como se define en las reivindicaciones.

Específicamente, la invención se refiere a un constructo polipeptídico que comprende:

- al menos un anticuerpo de un solo dominio dirigido contra una diana terapéutica y/o de diagnóstico, y
- al menos un anticuerpo de un solo dominio dirigido contra albúmina sérica humana, que es

a) SEQ ID NO: 1, o

50 b) un anticuerpo VHH de *Camelidae* humanizado que es una secuencia homóloga que presenta una identidad de secuencia de más del 90% con una secuencia representada por SEQ ID NO: 1, y que da reacción cruzada entre albúmina sérica de cerdo, humana, de ratón, de hámster y de conejo.

2. Un constructo polipeptídico según el punto 1, en el que:

- el número de anticuerpos de un solo dominio anti-diana es de al menos dos, y
- al menos dos anticuerpos de un solo dominio anti-diana no comparten la misma secuencia, o todos los anticuerpos de un solo dominio anti-diana comparten la misma secuencia.

3. Un constructo polipeptídico según el punto 1 ó 2, en el que el al menos un anticuerpo de un solo dominio que es un anticuerpo VHH de *Camelidae* humanizado y que es una secuencia homóloga que presenta una identidad de secuencia de más del 90% con una secuencia representada por SEQ ID NO: 1 puede unirse a su diana con una afinidad mejor que 10⁻⁶ M.

4. Un constructo polipeptídico según cualquiera de los puntos 1 a 3, en el que una diana es TNF-alfa.

- 5. Un constructo polipeptídico según cualquiera de los puntos 1 a 3, en el que una diana es vWF
- 6. Un ácido nucleico que codifica para un constructo polipeptídico según cualquiera de los puntos 1 a 5.

5 Breve descripción de las figuras y tablas

- Figura 1: ELISA de fago para mostrar que nanocuerpos específicos de HSA están presentes en la biblioteca tal como se describe en el ejemplo 4.
- 10 Figura 2: Unión de fagos que expresan los agentes de unión a albúmina, a plasma sometido a transferencia sobre nitrocelulosa tal como se describe en el ejemplo 8.
- Figura 3: Tinción de Coomassie de muestras de plasma en SDS-PAGE tal como se describe en el ejemplo 8.
- 15 Figura 4: Unión de nanocuerpos purificados a albúmina de ratón tal como se determina mediante ELISA tal como se describe en el ejemplo 10.
- Figura 5: Sitio de clonación múltiple de PAX011 para la construcción de nanocuerpos biespecíficos tal como se describe en el ejemplo 11.
- 20 Figura 6: ELISA de tipo sándwich para mostrar la funcionalidad de ambos nanocuerpos en el constructo biespecífico tal como se describe en el ejemplo 12.
- Figura 7: Optimización de ELISA para determinar la concentración de nanocuerpos en plasma al 10% o en sangre al 10% tal como se describe en el ejemplo 14.
- 25 Figura 8: Farmacocinética para el nanocuerpo anti-TNF- α monovalente en ratones tal como se determina mediante ELISA tal como se describe en el ejemplo 16.
- 30 Figura 9: Farmacocinética para el nanocuerpo biespecífico MSA21/TNF3E en ratones tal como se determina mediante ELISA tal como se describe en el ejemplo 16.
- Figura 10: Farmacocinética para el nanocuerpo biespecífico MSA21/TNF3E en ratones tal como se determina mediante ELISA con K208 en comparación con URL49 tal como se describe en el ejemplo 16.
- 35 Figura 11: Farmacocinética para el nanocuerpo biespecífico MSA24/TNF3E en ratones tal como se determina mediante ELISA tal como se describe en el ejemplo 16.
- Figura 12: Unión a vWF tal como se determina mediante ELISA, por VHH purificado tal como se describe en el ejemplo 23.
- 40 Figura 13: ELISA para someter a prueba la inhibición por VHH de la unión de vWF a colágeno tal como se describe en el ejemplo 24.
- 45 Figura 14: ELISA de tipo sándwich que muestra la funcionalidad de ambos VHH en un constructo biespecífico tal como se describe en el ejemplo 27.
- Tabla 1: Esquema de inmunización según el ejemplo 1.
- 50 Tabla 2: Resultados tras una y dos tandas de cribado con albúmina sérica de ratón tal como se describe en el ejemplo 5.
- Tabla 3: Se seleccionaron clones tras una y dos tandas de selección y se prepararon extractos periplasmáticos. Se analizaron estos clones en ELISA para determinar la unión a albúmina humana y de ratón tal como se describe en el ejemplo 6.
- 55 Tabla 4: Lista de secuencias.
- Tabla 5: Afinidades (k_{off} , k_{on} y KD) para agentes de unión a albúmina tal como se determina mediante BIACORE tal como se describe en el ejemplo 13.
- 60 Tabla 6: Resultados para el ensayo de LAL para nanocuerpos monovalentes y biespecíficos tras purificación en polimixina tal como se describe en el ejemplo 15.
- 65 Tabla 7: Esquema de inmunización usado para la llama 002 según el ejemplo 17.
Tabla 8: Unidades formadoras de placas (ufp) tras una o dos tandas de cribado con vWF en comparación con PBS-

caseína tal como se describe en el ejemplo 19. Ufp de vWF (antígeno) dividido entre ufp de caseína (una unión específica) = enriquecimiento.

5 Tabla 9: Número de inhibidores frente al número de clones sometidos a prueba tras la primera y la segunda tanda de cribado tal como se describe en el ejemplo 20.

Tabla 10: Concentración de VHH (nM) necesaria para inhibir la unión de vWF a colágeno en el 50% (CI50) tal como se describe en el ejemplo 23.

10 Tabla 11: Valores de CI50 para nanocuerpos biespecíficos contra albúmina y contra vWF tal como se describe en el ejemplo 28.

15 Tabla 12: Homologías fraccionadas entre las secuencias de aminoácidos de VHH anti-albúmina sérica de ratón de la invención.

Tabla 13: Homologías fraccionadas entre VHH anti-TNF-alfa de la invención.

Tabla 14: Homologías en porcentaje entre VHH anti-IFN-gamma de la invención.

20 Tabla 15: Homologías fraccionadas entre VHH anti-vWF de la invención.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención se refiere a un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se define en las reivindicaciones que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio cada uno dirigido contra una(s) proteína(s) sérica(s) de un sujeto, y uno o más anticuerpos de un solo dominio cada uno dirigido contra una(s) molécula(s) diana, y al hallazgo de que el constructo tiene una semivida prolongada significativamente en la circulación de dicho sujeto en comparación con la semivida del anticuerpo de un solo dominio anti-diana cuando no es parte de un constructo de este tipo.

30 Los anticuerpos de un solo dominio son anticuerpos cuyas regiones determinantes de complementariedad son parte de un polipéptido de un solo dominio. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos de cadena pesada, los anticuerpos que carecen de manera natural de cadenas ligeras, los anticuerpos de un solo dominio derivados de anticuerpos de 4 cadenas convencionales, los anticuerpos modificados mediante ingeniería y andamiajes de un solo dominio distintos de los derivados de anticuerpos. Los anticuerpos de un solo dominio pueden ser cualquier anticuerpo de un solo dominio de la técnica o futuro. Los anticuerpos de un solo dominio pueden derivarse de cualquier especie incluyendo, pero sin limitarse a, ratón, ser humano, camello, llama, cabra, conejo, bovino. Según un aspecto de la invención, un anticuerpo de un solo dominio tal como se usa en el presente documento es un anticuerpo de un solo dominio que se produce de manera natural conocido como anticuerpo de cadena pesada carente de cadenas ligeras. Tales anticuerpos de un solo dominio se dan a conocer en el documento WO 9404678, por ejemplo. Por motivos de claridad, este dominio variable derivado de un anticuerpo de cadena pesada que carece de manera natural de cadena ligera se conoce en el presente documento como VHH o nanocuerpo para distinguirlo de la VH convencional de las inmunoglobulinas de cuatro cadenas. Una molécula de VHH de este tipo puede derivarse de anticuerpos producidos en especies de *Camelidae*, por ejemplo, en camello, dromedario, alpaca y guanaco. Otras especies además de *Camelidae* pueden producir anticuerpos de cadena pesada que carecen de manera natural de cadena ligera; tales VHH están dentro del alcance de la invención.

50 El uno o más anticuerpos de un solo dominio del constructo polipeptídico que se dirigen contra una diana pueden tener la misma secuencia. Alternativamente pueden no tener todos la misma secuencia. Está dentro del alcance de la invención que un constructo polipeptídico heteroespecífico comprenda anticuerpos de un solo dominio anti-diana que no comparten todos la misma secuencia, pero que se dirigen contra la misma diana, o fragmento de la misma, uno o más antígenos de la misma.

55 Según la presente invención se proporcionan métodos para el uso de una pluralidad de anticuerpos de un solo dominio anti-diana y/o anti-proteína sérica para aumentar la avidéz y/o afinidad de la molécula heteroespecífica. De esta manera, pueden ampliarse las semividas séricas de moléculas modificadas según la invención. Tal modificación modificará y/o ampliará la ventana terapéutica de una molécula terapéutica específica. Esta flexibilidad no puede lograrse con métodos alternativos en la técnica, tal como cuando se usan péptidos con especificidad frente a proteínas séricas, diacuerpos que son difíciles de producir en forma multivalente, modificaciones químicas (tales como pegilación, acilación).

60 El uno o más anticuerpos de un solo dominio del constructo polipeptídico que se dirigen contra una proteína sérica pueden tener la misma secuencia. Alternativamente pueden no tener todos la misma secuencia. Está dentro del alcance de la invención que un constructo polipeptídico heteroespecífico comprenda anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica que no comparten todos la misma secuencia, pero que se dirigen contra la proteína sérica, o fragmento de la misma, uno o más antígenos de la misma.

En otra realización, uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-diana del constructo polipeptídico pueden dirigirse contra más de una diana (por ejemplo, vWF y colágeno). De manera similar, los anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica del constructo polipeptídico pueden dirigirse contra más de una proteína sérica (por ejemplo, albúmina sérica y fibrinógeno).

5 Los VHH, según la presente invención, y tal como conoce el destinatario experto, son dominios variables de cadena pesada derivados de inmunoglobulinas que carecen de manera natural de cadenas ligeras tales como los derivados de camélidos tal como se describe en el documento WO9404678 (y denominados continuación en el presente documento dominios VHH o nanocuerpos). Las moléculas de VHH son aproximadamente 10 veces más pequeñas que las moléculas de IgG. Son polipéptidos individuales y muy estables, que resisten condiciones extremas de pH y temperatura. Además, son resistentes a la acción de proteasas, lo que no es el caso para anticuerpos convencionales. Además, la expresión *in vitro* de VHH produce VHH funcionales plegados apropiadamente, con alto rendimiento. Además, los anticuerpos generados en camélidos reconocerán epítopos distintos de los reconocidos por anticuerpos generados *in vitro* a través del uso de bibliotecas de anticuerpos o mediante inmunización de mamíferos distintos de camélidos (documento WO 9749805). Como tales, los VHH anti-albúmina pueden interactuar de una manera más eficaz con albúmina sérica que se sabe que es una proteína transportadora. Como proteína transportadora, algunos de los epítopos de la albúmina sérica pueden ser inaccesibles por proteínas, péptidos y compuestos químicos pequeños unidos. Puesto que se sabe que los VHH se unen a epítopos "poco habituales" o no convencionales tales como cavidades (documento WO9749805), puede aumentarse la afinidad de tales VHH frente a albúmina circulante.

La presente invención también se refiere al hallazgo de que un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más VHH dirigidos contra una o más proteínas séricas de un sujeto, y uno o más VHH dirigidos contra una o más moléculas diana de dicho sujeto tiene sorprendentemente una semivida prolongada significativamente en la circulación de dicho sujeto en comparación con la semivida del VHH anti-diana cuando no es parte de dicho constructo. Además, tal semivida prolongada está en el intervalo de varios días debido a los VHH anti-diana de alta afinidad en comparación con varias horas cuando se usan péptidos de baja afinidad específicos para albúmina (Dennis *et al*, JBC, 277, 35035). La ampliación de la semivida se demuestra por los inventores en el presente documento, por ejemplo, en el ejemplo 16, y mediante el polipéptido representado por SEQ ID NO: 5. Además, se encontró que dicho constructo presentaba las mismas propiedades favorables de VHH tales como alta estabilidad permaneciendo intacto en ratones durante al menos 19 días (ejemplo 16), resistencia a pH extremo, estabilidad a alta temperatura y alta afinidad por la diana.

Una diana según la invención es cualquier sustancia biológica que puede unirse a un constructo polipeptídico heteroespecífico de la invención. Las dianas pueden ser, por ejemplo, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, ácidos oligonucleicos, sacáridos, polisacáridos, glicoproteínas. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, dianas terapéuticas, dianas de diagnóstico, receptores, ligandos de receptor, proteínas de la cubierta viral, proteínas del sistema inmunitario, hormonas, enzimas, antígenos, proteínas de señalización celular, o un fragmento de los mismos. Las dianas pueden ser una proteína nativa o un fragmento de la misma, una secuencia homóloga de la misma, una parte funcional de la misma o una parte funcional de una secuencia homóloga.

Las propiedades de anticuerpos de un solo dominio, en particular VHH, se comparan favorablemente con las de anticuerpos derivados de fuentes tales como ratón, oveja, cabra, conejo, etc. (es decir, los anticuerpos tradicionales) y derivados humanizados de los mismos. Los anticuerpos tradicionales no son estables a temperatura ambiente, y tienen que refrigerarse durante la preparación y el almacenamiento, requiriendo equipo de laboratorio, almacenamiento y transporte refrigerados necesarios, que contribuyen al tiempo y los gastos. La refrigeración a veces no es factible en países en vías de desarrollo. Además, la fabricación o la producción a pequeña escala de dichos anticuerpos es cara debido a que los sistemas celulares de mamíferos necesarios para la expresión de anticuerpos intactos y activos requieren altos niveles de soporte en cuanto a tiempo y equipo, y los rendimientos son muy bajos. Además, los anticuerpos tradicionales tienen una actividad de unión que depende del pH, y por tanto no son adecuados para su uso en entornos fuera del intervalo de pH fisiológico habitual tales como, por ejemplo, en el tratamiento de hemorragia gástrica, cirugía gástrica. Además, los anticuerpos tradicionales son inestables a bajo o alto pH y por tanto no son adecuados para la administración oral. Sin embargo, se ha demostrado que los VHH resisten condiciones difíciles, tales como pH extremo, reactivos desnaturizantes y altas temperaturas (Ewerf S *et al*, Biochemistry 19 de marzo de 2002; 41(11):3628-36), haciendo así que sean adecuados para la administración por vía oral. Además, los anticuerpos tradicionales tienen una actividad de unión que depende de la temperatura, y por tanto no son adecuados para su uso en ensayos o kits realizados a temperaturas fuera de los intervalos de temperatura biológicamente activos (por ejemplo, $37 \pm 20^\circ\text{C}$).

Además, los VHH son más solubles, lo que significa que pueden almacenarse y/o administrarse en mayores concentraciones en comparación con anticuerpos convencionales. Los polipéptidos de la presente invención también conservan la actividad de unión a un pH y una temperatura fuera de los intervalos fisiológicos habituales, lo que significa que pueden ser útiles en situaciones de pH y temperatura extremos que requieren una modulación de la agregación mediada por plaquetas, tales como en cirugía gástrica, control de hemorragia gástrica, ensayos realizados a temperatura ambiente, etc. Los polipéptidos de la presente invención también presentan una estabilidad prolongada en condiciones extremas de pH, lo que significa que serán adecuados para la administración por vía

oral. Los polipéptidos de la presente invención pueden producirse de manera rentable a través de fermentación en organismos huésped recombinantes convenientes tales como *Escherichia coli* y levaduras; a diferencia de los anticuerpos convencionales que también requieren de caras instalaciones de cultivo de células de mamíferos, los niveles de expresión que pueden lograrse son altos. Ejemplos de rendimientos de los polipéptidos de la presente invención son de 1 a 10 mg/ml (*E. coli*) y hasta 1 g/l (levaduras). Los polipéptidos de la presente invención también presentan alta afinidad de unión para una amplia gama de diferentes tipos de antígeno, y capacidad para unirse a epítomos no reconocidos por anticuerpos convencionales; por ejemplo, presentan largas estructuras en bucle basadas en CDR con el potencial de penetrar en cavidades y presentan inhibición de la función enzimática. Además, puesto que la unión se produce a menudo a través del bucle de CDR3 únicamente, se prevé que podrán usarse de manera terapéutica péptidos derivados de CDR3 (Desmyter *et al.*, J Biol Chem, 2001, 276: 26285-90). Los polipéptidos de la invención también pueden conservar la capacidad de unión completa como proteína de fusión con una enzima o toxina.

La presente invención también se refiere a un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más VHH cada uno dirigido contra una o más proteínas séricas de un sujeto, y uno o más VHH cada uno dirigido contra una o más moléculas diana, en el que los VHH pertenecen a la clase tradicional de anticuerpos de un solo dominio de cadena pesada de *Camelidae*. La presente invención también se refiere a un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más VHH cada uno dirigido contra una o más proteínas séricas de un sujeto, y uno o más VHH cada uno dirigido contra una o más moléculas diana, en el que los VHH pertenecen a una clase de anticuerpos de un solo dominio de cadena pesada de *Camelidae* que tienen secuencias similares a la humana. Una secuencia de VHH representada por SEQ ID NO: 12 que se une a TNF-alfa y un segundo VHH que se une a albúmina de ratón, pertenece a esta clase de péptidos de VHH. Como tales, los péptidos pertenecientes a esta clase muestran una alta homología de la secuencia de aminoácidos con regiones de entramado de VH humanas y dichos péptidos podrán administrarse a pacientes directamente sin la expectativa de una respuesta inmunitaria no deseada de los mismos, y sin la carga de humanización adicional.

En el documento WO03035694 se ha descrito una clase similar a la humana de anticuerpos de un solo dominio de *Camelidae* representados por SEQ ID No. 1, 3 y 4 y contienen los residuos FR2 hidrófobos que se encuentran normalmente en los anticuerpos convencionales de origen humano o de otra especie, pero que compensan esta pérdida de hidrofobicidad mediante otras sustituciones en la posición 103 que sustituye el residuo de triptófano conservado presente en VH de anticuerpos de cadena doble. Como tales, los péptidos pertenecientes a estas dos clases muestran una alta homología de la secuencia de aminoácidos con regiones de entramado de VH humanas y dichos péptidos podrán administrarse a un ser humano directamente sin la expectativa de una respuesta inmunitaria no deseada de los mismos, y sin la carga de humanización adicional.

Por tanto, un aspecto de la presente invención permite la administración directa de un constructo polipeptídico que comprende un polipéptido anti-albúmina sérica, en el que los anticuerpos de un solo dominio pertenecen a la clase humanizada de VHH y comprenden una secuencia representada por SEQ ID NO: 1, a un paciente que lo necesita.

Un sujeto tal como se usa en el presente documento es cualquier mamífero que tiene un sistema circulatorio en el que el fluido en el mismo comprende proteínas séricas. Los ejemplos de sistema circulatorio incluyen los sistemas sanguíneo y linfático. Los ejemplos de animales incluyen, pero no se limitan a, conejos, seres humanos, cabras, ratones, ratas, vacas, terneros, camellos, llamas, monos, burros, cobayas, gallinas, ovejas, perros, gatos, caballos, etc.

Una realización de la presente invención es un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende al menos un anticuerpo de un solo dominio dirigido contra una diana terapéutica y/o de diagnóstico, y al menos un anticuerpo de un solo dominio cada uno dirigido contra una o más proteínas séricas o polipéptidos tal como se definen en las reivindicaciones. Tal como ya se mencionó, los anticuerpos de un solo dominio anti-diana pueden tener la misma secuencia. Alternativamente, al menos dos anticuerpos de un solo dominio anti-diana pueden tener las secuencias diferentes, pero se dirigen contra el mismo epítomo o diferentes epítomos en la misma diana, fragmentos de la misma o antígeno de la misma. De manera similar, los anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica pueden tener la misma secuencia. Alternativamente, al menos dos anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica pueden tener las secuencias diferentes, pero se dirigen contra el mismo epítomo o diferentes epítomos en la misma proteína sérica, fragmentos de la misma o antígeno de la misma.

En otra realización de la presente invención, cuando más de un anticuerpo de un solo dominio anti-diana está presente en el constructo polipeptídico heteroespecífico, cada anticuerpo de un solo dominio anti-diana puede dirigirse contra una diana diferente (por ejemplo, uno contra vWF y otro contra colágeno). De manera similar, cuando más de un anticuerpo de un solo dominio anti-proteína sérica está presente, cada anticuerpo de un solo dominio anti-proteína sérica puede dirigirse contra una proteína sérica diferente (por ejemplo, uno contra albúmina sérica y otro contra fibrinógeno).

Una realización de la invención es un polipéptido heteroespecífico, en el que un anticuerpo de un solo dominio anti-proteína sérica corresponde a una secuencia representada por SEQ ID NO: 1.

Los constructos dados a conocer en el presente documento conservan las propiedades ventajosas de anticuerpos de un solo dominio (por ejemplo, VHH) y tienen una duración prolongada en la circulación de un individuo. Por tanto, tales constructos pueden circular en el suero del sujeto durante varios días, reduciendo la frecuencia de tratamiento, la incomodidad al sujeto y dando como resultado una reducción del coste de tratamiento. Además, un aspecto de la invención es que la semivida de los constructos polipeptídicos heteroespecíficos puede controlarse mediante el número de anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica presentes en el constructo. Una semivida controlable es deseable en varias circunstancias, por ejemplo, en la aplicación de una dosis programada de un constructo polipeptídico heteroespecífico terapéutico, o para obtener un efecto terapéutico deseado.

Según un aspecto de la invención, un constructo polipeptídico heteroespecífico puede ser una secuencia homóloga de un constructo polipeptídico heteroespecífico de longitud completa. Según otro aspecto de la invención, un constructo polipeptídico heteroespecífico puede ser una parte funcional de un constructo polipeptídico heteroespecífico de longitud completa. Según otro aspecto de la invención, un constructo polipeptídico heteroespecífico puede ser una secuencia homóloga de un constructo polipeptídico heteroespecífico de longitud completa. Según otro aspecto de la invención, un constructo polipeptídico heteroespecífico puede ser una parte funcional de una secuencia homóloga de un constructo polipeptídico heteroespecífico de longitud completa. Según un aspecto de la invención, un constructo polipeptídico heteroespecífico puede comprender una secuencia de un constructo polipeptídico heteroespecífico.

Según un aspecto de la invención, un anticuerpo de un solo dominio usado para formar un constructo polipeptídico heteroespecífico puede ser un anticuerpo de un solo dominio completo (por ejemplo, un VHH) o una secuencia homóloga del mismo. Según otro aspecto de la invención, un anticuerpo de un solo dominio usado para formar el constructo polipeptídico heteroespecífico puede ser una parte funcional de un anticuerpo de un solo dominio completo. Según otro aspecto de la invención, un anticuerpo de un solo dominio usado para formar el constructo polipeptídico heteroespecífico puede ser una secuencia homóloga de un anticuerpo de un solo dominio completo. Según otro aspecto de la invención, un anticuerpo de un solo dominio usado para formar el constructo polipeptídico heteroespecífico puede ser una parte funcional de una secuencia homóloga de un anticuerpo de un solo dominio completo.

Según otro aspecto de la invención, un constructo polipeptídico heteroespecífico puede ser una secuencia homóloga de la secuencia original. Según otro aspecto de la invención, un constructo polipeptídico heteroespecífico puede ser una parte funcional de la secuencia original. Según otro aspecto de la invención, un constructo polipeptídico heteroespecífico puede ser una parte funcional de una secuencia homóloga de la secuencia original.

Tal como se usa en el presente documento, una secuencia homóloga de la presente invención puede comprender adiciones, deleciones o sustituciones de uno o más aminoácidos, que no alteran sustancialmente las características funcionales de los polipéptidos de la invención. El número de deleciones o sustituciones de aminoácidos es preferiblemente de hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 ó 70 aminoácidos.

Una secuencia homóloga de la presente invención puede incluir un anticuerpo de un solo dominio de la invención que se ha humanizado.

Por humanizado quiere decirse mutado de modo que la inmunogenicidad tras la administración en pacientes humanos es menor o inexistente. La humanización de un anticuerpo de un solo dominio, según la presente invención, comprende una etapa de reemplazar uno o más aminoácidos por su homólogo humano tal como se encuentra en la secuencia consenso humana, sin que el polipéptido pierda su carácter típico, es decir, la humanización no afecta significativamente a la capacidad de unión a antígeno del polipéptido resultante. Tales métodos los conoce el destinatario experto. También puede realizarse una técnica de humanización aplicada a VHH de *Camelidae* mediante un método que comprende el reemplazo de cualquiera de los siguientes residuos o bien solos o bien en combinación: algunos VHH contienen residuos distintivos de *Camelidae* típicos en las posiciones 37, 44, 45 y 47 con características hidrófilas. El reemplazo de los residuos hidrófilos por residuos hidrófobos humanos en las posiciones 44 y 45 (E44G y R45L) no tuvo un efecto sobre la unión y/o inhibición. Puede requerirse humanización adicional mediante sustitución de residuos en FR1, tal como en las posiciones 1, 5, 28 y 30; FR3, tal como en las posiciones 74, 75, 76, 83, 84, 93 y 94; y FR4, tal como en las posiciones 103, 104, 108 y 111 (toda la numeración según Kabat).

Una realización es un método para humanizar un VHH que comprende las etapas de reemplazar cualquiera de los siguientes residuos o bien solos o bien en combinación:

FR1 posiciones 1, 5, 28 y 30,

el aminoácido distintivo en las posiciones 44 y 45 en FR2,

FR3 residuos 74, 75, 76, 83, 84, 93 y 94,

y posiciones 103, 104, 108 y 111 en FR4;

(numeración según la numeración de Kabat).

- 5 Algunas secuencias de VHH de *Camelidae* presentan una alta homología de secuencia con regiones de entramado de VH humanas y por tanto dichos VHH podrán administrarse a pacientes directamente sin la expectativa de una respuesta inmunitaria de los mismos, y sin la carga adicional de humanización. Por tanto, un aspecto de la presente invención permite la formación de un constructo polipeptídico heteroespecífico sin humanización del VHH, cuando dicho VHH presenta alta homología con regiones de entramado de VH humanas.
- 10 Una secuencia homóloga de la presente invención puede ser una secuencia de la invención derivada de otra especie tal como, por ejemplo, camello, llama, dromedario, alpaca, guanaco, etc.
- 15 Cuando la secuencia homóloga indica identidad de secuencia, significa una secuencia que presenta una alta identidad de secuencia (identidad de secuencia de más del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o el 98%) con un anticuerpo de un solo dominio de la invención, y se caracteriza preferiblemente por propiedades similares de la secuencia original, concretamente afinidad, calculándose dicha identidad usando métodos conocidos.
- 20 Una secuencia homóloga según la presente invención puede referirse a secuencias de nucleótidos de más de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 ó 1000 nucleótidos que pueden hibridarse con el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos que puede codificar para una secuencia nativa en condiciones de hibridación rigurosas (tales como las descritas por SAMBROOK *et al.*, Molecular Cloning, Laboratory Manual, Cold Spring, Harbor Laboratory Press, Nueva York).
- 25 Tal como se usa en el presente documento, una parte funcional se refiere a un anticuerpo de un solo dominio de longitud suficiente de manera que se mantiene la interacción de interés con una afinidad de 1×10^{-6} M o mejor.
- 30 Alternativamente, una parte funcional de un anticuerpo de un solo dominio de la invención comprende una delección parcial de la secuencia de aminoácidos completa y mantiene todavía el/los sitio(s) de unión y dominio(s) proteico(s) necesarios para la unión de, y la interacción con, la diana o proteína sérica.
- 35 Tal como se usa en el presente documento, una parte funcional de un anticuerpo de un solo dominio de la invención se refiere a menos del 100% de la secuencia (por ejemplo, el 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, etc.), pero que comprende 5 aminoácidos o más o 15 nucleótidos o más.
- 40 Una parte de un anticuerpo de un solo dominio de la invención se refiere a menos del 100% de la secuencia (por ejemplo, el 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, etc.), pero que comprende 5 aminoácidos o más o 15 nucleótidos o más.
- 45 Las dianas tal como se mencionan en el presente documento tales como TNF-alfa, receptor de IFN-gamma, proteínas séricas (por ejemplo, albúmina sérica, inmunoglobulinas séricas, proteína de unión a tiroxina, transferrina, fibrinógeno) e IFN-gamma pueden ser fragmentos de dichas dianas. Por tanto una diana es también un fragmento de dicha diana, que puede provocar una respuesta inmunitaria. Una diana es también un fragmento de dicha diana, que puede unirse a un anticuerpo de un solo dominio producido contra la diana de longitud completa.
- 50 Un fragmento tal como se usa en el presente documento se refiere a menos del 100% de la secuencia (por ejemplo, el 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% etc.), pero que comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 aminoácidos o más. Un fragmento tiene una longitud suficiente de manera que se mantiene la interacción de interés con una afinidad de 1×10^{-6} M o mejor.
- 55 Un fragmento tal como se usa en el presente documento también se refiere a inserciones, delecciones y sustituciones opcionales de uno o más aminoácidos que no alteran de manera sustancial la capacidad de la diana para unirse a un anticuerpo de un solo dominio producido contra la diana de tipo natural. El número de inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos es preferiblemente de hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 7, 8, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 51, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 ó 70 aminoácidos.
- La proteína sérica es albúmina sérica humana.
- 60 Un anticuerpo de un solo dominio dirigido contra una diana significa anticuerpo de un solo dominio que puede unirse a su diana con una afinidad mejor que 10^{-6} M.
- 65 Los constructos polipeptídicos heteroespecíficos dados a conocer en el presente documento pueden prepararse por el experto en la técnica según métodos conocidos en la técnica o cualquier método futuro. Por ejemplo, pueden obtenerse VHH usando métodos conocidos en la técnica tales como mediante la inmunización de un camello y la obtención de hibridomas del mismo, o mediante la clonación de una biblioteca de anticuerpos de un solo dominio

usando técnicas de biología molecular conocidas en la técnica y posterior selección usando presentación en fago.

El anticuerpo de un solo dominio anti-proteína sérica puede dirigirse contra un polipéptido de una proteína sérica o una proteína entera. El anticuerpo de un solo dominio anti-diana puede dirigirse contra un polipéptido de dicha diana de la diana entera. En la técnica se conocen bien métodos para someter a barrido una proteína para determinar polipéptidos inmunogénicos.

Los anticuerpos de un solo dominio pueden unirse usando métodos conocidos en la técnica o cualquier método futuro. Por ejemplo, pueden fusionarse mediante reticulación química haciendo reaccionar residuos de aminoácido con un agente de derivatización orgánico tal como se describe por Blattler *et al*, Biochemistry 24,1517-1524; documento EP294703. Alternativamente, el anticuerpo de un solo dominio puede fusionarse genéticamente a nivel del ADN, es decir, un constructo polinucleotídico formado que codifica para el constructo polipeptídico completo que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-diana y uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica. En la solicitud de patente PCT WO 96/34103 se da a conocer un método para producir constructos polipeptídicos de VHH bivalentes o multivalentes. Una manera de unir múltiples anticuerpos de un solo dominio es mediante la ruta genética ligando secuencias codificantes de anticuerpo de un solo dominio o bien directamente o bien mediante un ligador peptídico. Por ejemplo, el extremo C-terminal del primer anticuerpo de un solo dominio puede ligarse al extremo N-terminal del siguiente anticuerpo de un solo dominio. Este modo de ligamiento puede ampliarse con el fin de ligar anticuerpos de un solo dominio adicionales para la construcción y producción de constructos tri-, tetrafuncionales, etc.

Un aspecto es la administración de constructos polipeptídicos heteroespecíficos según la invención que evita la necesidad de inyección. Los agentes terapéuticos basados en anticuerpos convencionales tienen un potencial significativo como fármacos porque tienen una especificidad exquisita para su diana y una baja toxicidad inherente, sin embargo, tienen un inconveniente importante: son grandes moléculas complejas y por tanto relativamente inestables, y son sensibles a la degradación por proteasas. Esto significa que los fármacos de anticuerpos convencionales no pueden administrarse por vía oral, por vía sublingual, de manera tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inhalación porque no son resistentes al pH bajo en estos sitios, la acción de proteasas en estos sitios y en la sangre y/o por su gran tamaño. Tienen que administrarse mediante inyección (por vía intravenosa, por vía subcutánea, etc.) para superar algunos de estos problemas. La administración mediante inyección requiere formación especializada para usar una jeringa hipodérmica o una aguja correctamente y de manera segura. Requiere además equipo estéril, una formulación líquida del polipéptido terapéutico, envasado en viales de dicho polipéptido en una forma estéril y estable y, del sujeto, un sitio adecuado para la introducción de la aguja. Además, los sujetos experimentan comúnmente estrés físico y psicológico antes y al recibir una inyección. Un aspecto de la presente invención supera estos problemas de la técnica anterior, proporcionando los constructos polipeptídicos heteroespecíficos de la presente invención. Dichos constructos son lo suficientemente pequeños, resistentes y estables como para administrarse por vía oral, por vía sublingual, de manera tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inhalación de manera sustancial sin pérdida de actividad. Los constructos polipeptídicos heteroespecíficos de la presente invención evitan la necesidad de inyecciones, no sólo ahorran coste/tiempo, sino que también son más convenientes y más cómodos para el sujeto.

Una realización es un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende al menos un anticuerpo de un solo dominio dirigido contra una diana para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de trastornos susceptibles de modulación mediante un compuesto terapéutico anti-diana que puede pasar a través del entorno gástrico sin inactivarse.

Tal como conocen los expertos en la técnica, una vez en posesión de dicho constructo polipeptídico, puede aplicarse tecnología de formulación para liberar una cantidad máxima de VHH en la ubicación correcta (en el estómago, en el colon, etc.). Este método de administración es importante para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de un trastorno cuyas dianas están ubicadas en el sistema intestinal.

Un aspecto es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de un trastorno susceptible de modulación mediante un compuesto terapéutico que puede pasar a través del entorno gástrico sin inactivarse, mediante la administración por vía oral a un sujeto de un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio específicos para antígeno relacionado con el trastorno.

Otra realización es un uso de un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación mediante un compuesto terapéutico anti-diana que puede pasar a través del entorno gástrico sin inactivarse.

Un aspecto es un método para administrar un compuesto terapéutico anti-diana al sistema intestinal sin inactivarse, mediante la administración por vía oral a un sujeto de un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio dirigidos contra dicha diana.

Un aspecto es un método para administrar un compuesto terapéutico anti-diana al torrente sanguíneo de un sujeto

sin inactivarse, mediante la administración por vía oral a un sujeto de un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio dirigidos contra dicha diana.

5 Otra realización es un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende al menos un anticuerpo de un solo dominio dirigido contra una diana en el presente documento para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de trastornos susceptibles de modulación mediante un compuesto terapéutico anti-diana administrado al tracto vaginal y/o rectal.

10 En un ejemplo no limitativo, una formulación según la invención comprende un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento que comprende uno o más VHH dirigidos contra una o más dianas en forma de un gel, una crema, un supositorio, una película o en forma de una esponja o como anillo vaginal que libera lentamente el principio activo a lo largo del tiempo (tales formulaciones se describen en los documentos EP 707473, EP 684814, US 5629001).

15 Un aspecto es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación mediante un compuesto terapéutico al tracto vaginal y/o rectal, mediante la administración por vía vaginal y/o por vía rectal a un sujeto de un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio específicos para antígeno relacionado con el trastorno.

20 Otra realización es un uso de un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación mediante un compuesto terapéutico anti-diana administrado al tracto vaginal y/o rectal sin inactivarse.

25 Un aspecto es un método para administrar un compuesto terapéutico anti-diana al tracto vaginal y/o rectal sin inactivarse, mediante la administración al tracto vaginal y/o rectal de un sujeto de un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio dirigidos contra dicha diana.

30 Un aspecto es un método para administrar un compuesto terapéutico anti-diana al torrente sanguíneo de un sujeto sin inactivarse, mediante la administración al tracto vaginal y/o rectal de un sujeto de un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio dirigidos contra dicha diana.

35 Otra realización es un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende al menos un anticuerpo de un solo dominio dirigido contra una diana que comprende al menos un anticuerpo de un solo dominio dirigido contra una diana, para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de trastornos susceptibles de modulación mediante un compuesto terapéutico anti-diana administrado a la nariz, las vías respiratorias altas y/o el pulmón.

40 En un ejemplo no limitativo, una formulación según la invención comprende un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento dirigido contra una o más dianas en forma de una pulverización nasal (por ejemplo, un aerosol) o inhalador. Puesto que el constructo es pequeño, puede alcanzar su diana de manera mucho más eficaz que moléculas de IgG terapéuticas.

45 Un aspecto es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación mediante un compuesto terapéutico administrado a las vías respiratorias altas y el pulmón, mediante la administración a un sujeto de un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento en el que uno o más anticuerpos de un solo dominio son específicos para un antígeno relacionado con el trastorno, mediante inhalación a través de la boca o la nariz.

50 Otro aspecto es una composición de VHH dispersable, en particular composiciones de VHH dispersables de polvo seco, tales como las descritas en el documento US 6514496. Estas composiciones de polvo seco comprenden una pluralidad de partículas secas diferenciadas con un tamaño de partícula promedio en el intervalo de 0,4-10 mm. Tales polvos pueden dispersarse fácilmente en un dispositivo de inhalación. Los VHH son particularmente idóneos para tal composición ya que el material liofilizado puede disolverse fácilmente (en el pulmón de forma posterior a inhalarse) debido a su alta capacidad de solubilización (Muyldermans, S., Reviews in Molecular Biotechnology, 74, 277-303, (2001)). Alternativamente, tales formulaciones de VHH liofilizadas pueden reconstituirse con un diluyente para generar una formulación reconstituida estable adecuada para la administración subcutánea. Por ejemplo, se han preparado formulaciones de anticuerpos anti-IgE (ejemplo 1; documentos US 6267958, EP 841946) que son útiles para tratar asma alérgica.

60 Otra realización es un uso de un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación mediante un compuesto terapéutico anti-diana administrado a la nariz, las vías respiratorias altas y/o el pulmón sin inactivarse.

65 Un aspecto es un método para administrar un compuesto terapéutico anti-diana a la nariz, las vías respiratorias altas

y el pulmón, mediante la administración a la nariz, las vías respiratorias altas y/o el pulmón de un sujeto de un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio dirigidos contra dicha diana.

5 Un aspecto es un método para administrar un compuesto terapéutico anti-diana a la nariz, las vías respiratorias altas y/o el pulmón sin inactivarse, mediante la administración a la nariz, las vías respiratorias altas y/o el pulmón de un sujeto de un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio dirigidos contra dicha diana.

10 Un aspecto es un método para administrar un compuesto terapéutico anti-diana al torrente sanguíneo de un sujeto sin inactivarse mediante la administración a la nariz, las vías respiratorias altas y/o el pulmón de un sujeto de un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio dirigidos contra dicha diana.

15 Una realización es un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de trastornos susceptibles de modulación mediante un compuesto terapéutico anti-diana administrado a la mucosa intestinal, en el que dicho trastorno aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal. Debido a su pequeño tamaño, un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento puede pasar a través de la mucosa intestinal y
20 alcanzar el torrente sanguíneo de manera más eficaz en sujetos que padecen trastornos que provocan un aumento en la permeabilidad de la mucosa intestinal.

Un aspecto es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación mediante un compuesto terapéutico anti-diana administrado a la mucosa intestinal, en el que dicho trastorno
25 aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal, mediante la administración por vía oral a un sujeto de un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento.

Este proceso puede potenciarse incluso adicionalmente mediante un aspecto adicional de la presente invención, el uso de portadores de transporte activo. En este aspecto de la invención, VHH se fusiona a un portador que potencia
30 la transferencia a través de la pared intestinal al torrente sanguíneo. En un ejemplo no limitativo, este "portador" es un segundo VHH que se fusiona al VHH terapéutico. Tales constructos de fusión se preparan usando métodos conocidos en la técnica. El VHH "portador" se une específicamente a un receptor en la pared intestinal que induce una transferencia activa a través de la pared.

35 Otra realización es un uso de un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación mediante un compuesto terapéutico anti-diana administrado a la mucosa intestinal, en el que dicho trastorno aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal.

40 Un aspecto es un método para administrar un compuesto terapéutico anti-diana a la mucosa intestinal sin inactivarse, mediante la administración por vía oral a un sujeto de un constructo polipeptídico heteroespecífico de la invención.

45 Un aspecto es un método para administrar un compuesto terapéutico anti-diana al torrente sanguíneo de un sujeto sin inactivarse, mediante la administración por vía oral a un sujeto de un constructo polipeptídico heteroespecífico de la invención.

Este proceso puede potenciarse incluso adicionalmente mediante un aspecto adicional de la presente invención, el uso de portadores de transporte activo. En este aspecto de la invención, un constructo polipeptídico heteroespecífico
50 tal como se describe en el presente documento se fusiona a un portador que potencia la transferencia a través de la pared intestinal al torrente sanguíneo. En un ejemplo no limitativo, este "portador" es un VHH que se fusiona a dicho polipéptido. Tales constructos de fusión se prepararon usando métodos conocidos en la técnica. El VHH "portador" se une específicamente a un receptor en la pared intestinal que induce una transferencia activa a través de la pared.

55 Una realización es un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende al menos un anticuerpo de un solo dominio dirigido contra una diana para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de trastornos susceptibles de modulación mediante un compuesto terapéutico anti-diana que puede pasar a través de los tejidos bajo la lengua de manera eficaz. Una formulación de dicho constructo polipeptídico tal como se da a conocer en el presente documento, por ejemplo, un comprimido, una pulverización, una gota, se pone bajo la lengua
60 y se adsorbe a través de las membranas mucosas a la red capilar bajo la lengua.

Un aspecto es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación mediante un compuesto terapéutico que puede pasar a través de los tejidos bajo la lengua de manera eficaz,
65 mediante la administración por vía sublingual a un sujeto de un VHH específico para un antígeno relacionado con el trastorno.

- Otra realización es un uso de un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación mediante un compuesto terapéutico anti-diana que puede pasar a través de los tejidos bajo la lengua.
- 5 Un aspecto es un método para administrar un compuesto terapéutico anti-diana a los tejidos bajo la lengua sin inactivarse, mediante la administración por vía oral a un sujeto de un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio dirigidos contra dicha diana.
- 10 Un aspecto es un método para administrar un compuesto terapéutico anti-diana al torrente sanguíneo de un sujeto sin inactivarse, mediante la administración por vía oral a un sujeto de un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio dirigidos contra dicha diana.
- 15 Una realización es un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende al menos un anticuerpo de un solo dominio para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de trastornos susceptibles de modulación mediante un compuesto terapéutico anti-diana que puede pasar a través de la piel de manera eficaz. Una formulación de dicho constructo polipeptídico, por ejemplo, una crema, una película, una pulverización, una gota, un parche, se coloca sobre la piel y pasa a través de la misma.
- 20 Un aspecto es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación mediante un compuesto terapéutico que puede pasar a través de la piel de manera eficaz, mediante la administración de manera tópica a un sujeto de un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio específicos para un antígeno relacionado con el trastorno.
- 25 Otro aspecto es el uso de un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento como composición oftálmica tópica para el tratamiento de un trastorno ocular, tal como trastornos alérgicos, método que comprende la administración tópica de una composición oftálmica que comprende un constructo polipeptídico tal como se da a conocer en el presente documento, comprendiendo dicho constructo uno o más VHH anti-IgE (ejemplo 1, ejemplo 2).
- 30 Otra realización es un uso de un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos susceptibles de modulación mediante un compuesto terapéutico anti-diana que puede pasar a través de la piel de manera eficaz.
- 35 Un aspecto es un método para administrar un compuesto terapéutico anti-diana a la piel sin inactivarse, mediante la administración de manera tópica a un sujeto de un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio dirigidos contra dicha diana.
- 40 Un aspecto es un método para administrar un compuesto terapéutico anti-diana al torrente sanguíneo de un sujeto, mediante la administración de manera tópica a un sujeto de un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio dirigidos contra dicha diana.
- 45 En otra realización, un constructo polipeptídico heteroespecífico comprende además un anticuerpo de un solo dominio portador (por ejemplo, VHH) que actúa como portador de transporte activo para el transporte de dicho constructo polipeptídico heteroespecífico, de la luz pulmonar a la sangre.
- 50 Un constructo polipeptídico que comprende además un portador se une específicamente a un receptor presente en la superficie mucosa (células epiteliales bronquiales) dando como resultado el transporte activo del polipéptido desde la luz pulmonar hasta la sangre. El anticuerpo de un solo dominio portador puede fusionarse al constructo polipeptídico. Tales constructos de fusión se prepararon usando métodos conocidos en la técnica y se describen en el presente documento. El anticuerpo de un solo dominio "portador" se une específicamente a un receptor en la superficie mucosa que induce una transferencia activa a través de la superficie.
- 55 Otro aspecto es un método para determinar qué anticuerpos de un solo dominio (por ejemplo, VHH) se transportan de manera activa al torrente sanguíneo tras la administración nasal. De manera similar, una biblioteca en fago de VHH no expuestos previamente o inmunes puede administrarse por vía nasal, y tras diferentes puntos de tiempo tras la administración, pueden aislarse sangre u órganos para rescatar los fagos que se han transportado de manera activa al torrente sanguíneo. Un ejemplo no limitativo de un receptor para el transporte activo desde la luz pulmonar hasta el torrente sanguíneo es el receptor N de Fc (FcRn). Un aspecto de la invención incluye las moléculas de VHH identificadas mediante el método. Tales VHH pueden usarse entonces como VHH portador para la administración de un VHH terapéutico a la diana correspondiente en el torrente sanguíneo tras la administración nasal.
- 60 Una realización es un constructo polipeptídico heteroespecífico para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de trastornos que requieren la administración de un compuesto terapéutico por vía
- 65

intravenosa. Un aspecto de la invención es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de trastornos que requieren la administración de un compuesto terapéutico a través del torrente sanguíneo.

5 Otra realización es un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de un trastorno que requiere un compuesto terapéutico o de diagnóstico que no se elimina rápidamente de la circulación. Un aspecto de la invención es el uso de dicho constructo para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de un trastorno que requiere un compuesto terapéutico o de diagnóstico que no se elimina rápidamente de la circulación. Otro aspecto de la invención es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de un trastorno que requiere un compuesto terapéutico o de diagnóstico que no se elimina rápidamente de la circulación mediante la administración de un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento a un individuo. Según la presente invención, el anticuerpo de un solo dominio anti-diana de dicho polipéptido heteroespecífico se dirige contra una diana implicada en una causa o una manifestación de dicho trastorno, o implicada en causar los síntomas del mismo. Usando un constructo polipeptídico heteroespecífico de la presente invención para tratar o diagnosticar un trastorno mencionado anteriormente, se retarda el agotamiento de dicho constructo.

20 Otra realización es un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de un trastorno que requiere un compuesto terapéutico o de diagnóstico que sigue siendo activo en la circulación durante periodos de tiempo prolongados. Un aspecto de la invención es el uso de dicho constructo para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de un trastorno que requiere un compuesto terapéutico o de diagnóstico que sigue siendo activo en la circulación durante periodos de tiempo prolongados. Otro aspecto de la invención es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de un trastorno que requiere un compuesto terapéutico o de diagnóstico que puede circular en el suero de los pacientes durante varios días, mediante la administración de un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento a un individuo. Según la presente invención, el anticuerpo de un solo dominio anti-diana de dicho polipéptido heteroespecífico se dirige contra una diana implicada en una causa o una manifestación de dicho trastorno, o implicada en causar los síntomas del mismo. Usando un constructo polipeptídico heteroespecífico de la presente invención para tratar o diagnosticar un trastorno mencionado anteriormente, se reduce la frecuencia de tratamiento, dando así como resultado una disminución del coste de tratamiento.

35 Otra realización es un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de un trastorno relacionado con alergias. Un aspecto es el uso de dicho constructo para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de un trastorno relacionado con alergias. Otro aspecto de la invención es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de un trastorno relacionado con alergias, mediante la administración de un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento a un individuo. Según la presente invención, el anticuerpo de un solo dominio anti-diana de dicho polipéptido heteroespecífico se dirige contra una diana implicada en una causa o una manifestación de dicho trastorno, o implicada en causar los síntomas del mismo.

45 Los aspectos y las realizaciones anteriores de la invención también se aplican cuando un anticuerpo de un solo dominio anti-proteína sérica de los constructos polipeptídicos heteroespecíficos mencionados anteriormente corresponde a una secuencia representada por SEQ ID NO: 1, una secuencia homóloga de la misma tal como se define en las reivindicaciones.

50 Los aspectos y las realizaciones anteriores también se aplican cuando un constructo polipeptídico heteroespecífico de la invención corresponde a una secuencia representada por cualquiera de SEQ ID NO: 5 a 18, una secuencia homóloga de la misma, una parte funcional de la misma o una secuencia homóloga de una parte funcional. Dichas secuencias comprenden un VHH de *Camelidae* anti-TNF-alfa.

55 Los aspectos y las realizaciones anteriores también se aplican cuando un constructo polipeptídico heteroespecífico de la invención corresponde a una secuencia representada por cualquiera de SEQ ID NO: 19 a 21, una secuencia homóloga de la misma, una parte funcional de la misma o una secuencia homóloga de una parte funcional. Dichas secuencias comprenden un VHH de *Camelidae* anti-vWF.

60 Los aspectos y las realizaciones anteriores también se aplican cuando un constructo polipeptídico heteroespecífico de la invención corresponde a una secuencia representada por cualquiera de SEQ ID NO: 22 a 24, una secuencia homóloga de la misma, una parte funcional de la misma. Dichas secuencias comprenden un VHH de *Camelidae* anti-IgE.

65 Los aspectos y las realizaciones anteriores también se aplican cuando un constructo polipeptídico heteroespecífico según la invención corresponde a una secuencia representada por cualquiera de SEQ ID NO: 25 a 27, una secuencia homóloga de la misma, una parte funcional de la misma o una secuencia homóloga de una parte funcional. Dichas secuencias comprenden un VHH de *Camelidae* anti-interferón-gamma.

Un ejemplo no limitativo, en relación con alergias, de una diana contra la que puede dirigirse un anticuerpo de un solo dominio anti-diana es IgE. Durante su vida, los sujetos pueden desarrollar una respuesta alérgica frente a parásitos inofensivos tales como *Dermatophagoides pteronyssinus*, el ácaro del polvo doméstico o frente a sustancias tales como masas de microorganismos, plásticos, metales. Esto da como resultado una inducción de moléculas de IgE que inicia una cascada de respuestas inmunológicas. Un aspecto de la presente invención es un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-IgE fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica. En un aspecto de la invención, dichos anticuerpos de un solo dominio anti-IgE impiden la interacción de IgE con su(s) receptor(es) en mastocitos y basófilos, bloqueando así la iniciación de la cascada inmunológica y una reacción alérgica posterior. En otro aspecto, un anticuerpo de un solo dominio anti-proteína sérica se dirige contra una de las proteínas séricas del sujeto. Por tanto, un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento reduce o previene una respuesta alérgica debida a alérgenos comunes o poco habituales. Además, el constructo tiene una duración prolongada en la sangre aumentando así la ventana terapéutica.

Se cree que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) desempeña un papel importante en diversas enfermedades, por ejemplo, en enfermedades inflamatorias tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y esclerosis múltiple. Se han estudiado tanto TNF-alfa como los receptores (CD120a, CD120b) en gran detalle. TNF-alfa en su forma bioactiva es un trímero y el surco formado por subunidades vecinas es importante para la interacción citocina-receptor. Se han desarrollado varias estrategias para antagonizar la acción de la citocina y se usan actualmente para tratar diversos estados patológicos.

Un inhibidor de TNF que tenga suficiente especificidad y selectividad frente a TNF puede ser un compuesto farmacéutico profiláctico o terapéutico eficaz para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias. Sin embargo, es un proceso extremadamente difícil y largo desarrollar una entidad química pequeña (NEQ) con suficiente potencia y selectividad frente a tal secuencia diana. Los agentes terapéuticos basados en anticuerpos tienen, por otro lado, un potencial significativo como fármacos porque tienen una especificidad exquisita para su diana y una baja toxicidad inherente. Además, puede reducirse considerablemente el tiempo de desarrollo en comparación con el desarrollo de nuevas entidades químicas (NEQ). Sin embargo, los anticuerpos convencionales son difíciles de producir contra proteínas multiméricas en las que el dominio de unión al receptor del ligando está incluido en un surco, como es el caso con TNF-alfa.

Los constructos polipeptídicos heteroespecíficos de la presente invención, en los que el anticuerpo de un solo dominio anti-diana se dirige contra TNF-alfa, superan los problemas experimentados usando agentes terapéuticos peptídicos de la técnica debido a las propiedades tales como estabilidad, tamaño y expresión fiable. Además, los inventores han encontrado que, a pesar de la presencia de un surco en TNF-alfa multimérico, los constructos polipeptídicos heteroespecíficos todavía pueden lograr una fuerte unión a TNF-alfa

Otra realización es un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de un trastorno mediado por moléculas inflamatorias. Un aspecto de la invención es el uso de dicho constructo para la preparación de un medicamento para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de un trastorno mediado por moléculas inflamatorias. Otro aspecto de la invención es un método para tratar, prevenir y/o aliviar los síntomas de un trastorno mediado por moléculas inflamatorias, mediante la administración de un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento a un individuo. Según la presente invención, un anticuerpo de un solo dominio anti-diana de dicho polipéptido heteroespecífico se dirige contra una diana implicada en una causa o una manifestación de dicho trastorno, o implicada en causar los síntomas del mismo.

Según un aspecto de la invención, una diana contra la que se dirige un anticuerpo de un solo dominio de un constructo polipeptídico heteroespecífico es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa). Se cree que TNF-alfa desempeña un papel importante en diversos trastornos, por ejemplo, en trastornos inflamatorios tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y esclerosis múltiple.

Los anticuerpos de un solo dominio anti-diana pueden dirigirse contra TNF-alfa entero o un fragmento del mismo, o un fragmento de una secuencia homóloga del mismo.

Un aspecto se refiere a un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-TNF-alfa fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica, correspondiendo las secuencias de dicho polipéptido heteroespecífico a cualquiera de SEQ ID NO: 5 a 18. Los anticuerpos de un solo dominio anti-TNF-alfa en el mismo se derivan de anticuerpos de cadena pesada (VHH) de *Camelidae*, que se unen a TNF-alfa.

Una realización de la presente invención es un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-TNF-alfa fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de trastornos inflamatorios. TNF-alfa está implicado en procesos inflamatorios, y el bloqueo de la acción de TNF-alfa puede tener un efecto antiinflamatorio, que es altamente deseable en determinados estados de trastornos tales como, por ejemplo,

enfermedad de Crohn. La administración oral de este constructo polipeptídico heteroespecífico da como resultado la administración de tales moléculas en una forma activa en el colon en sitios que están afectados por el trastorno. Estos sitios están sumamente inflamados y contienen células productoras de TNF-alfa. Estos constructos polipeptídicos heteroespecíficos pueden neutralizar el TNF-alfa localmente, evitando la distribución por todo el cuerpo y por tanto limitando los efectos secundarios negativos. Microorganismos modificados genéticamente tales como *Micrococcus lactis* pueden secretar fragmentos de anticuerpos. Tales microorganismos modificados pueden usarse como vehículos para la producción local y la administración de fragmentos de anticuerpos en el intestino. Usando una cepa que produce un constructo polipeptídico heteroespecífico neutralizante de TNF-alfa, podrá tratarse un trastorno inflamatorio del intestino.

Otro aspecto es un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-TNF-alfa fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de trastornos relacionados con procesos inflamatorios, en el que dicho constructo polipeptídico heteroespecífico se administra por vía intravenosa, por vía oral, por vía sublingual, de manera tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inhalación.

Otro aspecto es el uso de un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-TNF-alfa fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica para la preparación de un medicamento para el tratamiento, la prevención y/o el alivio de trastornos relacionados con procesos inflamatorios, en el que dicho constructo polipeptídico heteroespecífico se administra por vía intravenosa, por vía oral, por vía sublingual, de manera tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inhalación.

Otro aspecto es un método de tratamiento, prevención y/o alivio de trastornos relacionados con procesos inflamatorios, que comprende administrar a un sujeto un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-TNF-alfa fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica por vía intravenosa, por vía oral, por vía sublingual, de manera tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inhalación.

Otro aspecto es un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-TNF-alfa fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de trastornos relacionados con procesos inflamatorios.

Otro aspecto es un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-TNF-alfa fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica para la preparación de un medicamento para el tratamiento, la prevención y/o el alivio de trastornos relacionados con procesos inflamatorios.

Un aspecto de la invención es que los anticuerpos de un solo dominio anti-TNF-alfa de la presente invención pueden derivarse de VHH de cualquier clase. Por ejemplo, pueden derivarse de una clase de VHH con alta homología con la secuencia de VH humana, o pueden derivarse de cualquiera de las otras clases de VHH, incluyendo la clase principal de VHH. Estos VHH incluyen los dominios VHH de *Camelidae* de longitud completa y pueden comprender un dominio de Fc humano si son necesarias funciones efectoras.

Los aspectos y las realizaciones anteriores se aplican a un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-TNF-alfa fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica, en el que dicho polipéptido heteroespecífico corresponde a una secuencia representada por cualquiera de SEQ ID NO: 5 a 18, una secuencia homóloga de la misma, una parte funcional de la misma o una secuencia homóloga de una parte funcional de la misma. SEQ ID NO: 5 a 18 comprenden VHH de *Camelidae* anti-TNF-alfa y VHH de *Camelidae* anti-albúmina sérica de ratón.

Los aspectos y las realizaciones anteriores se aplican a un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-TNF-alfa fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica en el que dichos anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica corresponden a SEQ ID NO: 1 (VHH de *Camelidae* anti-proteína sérica), una secuencia homóloga de la misma, tal como se define en las reivindicaciones.

Los inventores han encontrado que un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende una secuencia correspondiente a cualquiera de SEQ ID NO: 5 a 18 presenta sorprendentemente una afinidad mayor que la esperada hacia su diana y semivida prolongada en el sistema circulatorio.

La agregación mediada por plaquetas es el proceso en el que el colágeno unido al factor de von Willebrand (vWF) se adhiere a las plaquetas y/o receptores de plaquetas (ejemplos de ambos son gpl^a/IIa, gpl^b o colágeno), dando como resultado en última instancia la activación plaquetaria. La activación plaquetaria conduce a la unión de fibrinógeno y finalmente a agregación plaquetaria. La capacidad para alterar la agregación mediada por plaquetas tiene muchas aplicaciones incluyendo el tratamiento de una enfermedad tal como se menciona a continuación. Puesto que los constructos polipeptídicos heteroespecíficos de la invención previenen de manera eficaz la

coagulación, y la semivida de los mismos puede controlarse, pueden usarse para intervenciones quirúrgicas, por ejemplo, que requieren una inhibición de la agregación mediada por plaquetas durante un periodo de tiempo limitado.

5 Los anticuerpos de un solo dominio monovalentes tales como VHH muestran sorprendentemente alta inhibición de la agregación plaquetaria en experimentos para medir la inhibición de la agregación plaquetaria con alto cizallamiento: se obtuvo una inhibición del 50% de la agregación plaquetaria a una concentración de entre 4 y 25 nM. En comparación, el fragmento Fab derivado de un anticuerpo específico para vWF que inhibe la interacción con colágeno, 82D6A3, inhibe el 50% de la agregación plaquetaria a una concentración aproximadamente veinte veces mayor (Vanhoorelbeke K. *et al*, Journal of Biological Chemistry, 2003, 278: 37815-37821). Estos resultados fueron inesperados dado que los valores de CI50 para los VHH monovalentes son hasta 225 veces peores en ELISA que el valor de CI50 de la IgG de 82D6A3.

15 Esto muestra claramente que los anticuerpos IgG no son idóneos para la interacción con macromoléculas que están empezando a agregarse, o se encuentran en el proceso de agregación, tales como las implicadas en la agregación mediada por plaquetas. vWF produce multímeros de hasta 60 monómeros (multímeros finales de hasta 20 millones de dalton de tamaño). En efecto, se ha mostrado que no todos los dominios A3 son accesibles para 82D6A3 (Dongmei WU, Blood, 2002, 99, 3623 a 3628). Además el gran tamaño de los anticuerpos convencionales restringiría la penetración en el tejido, por ejemplo, durante la agregación mediada por plaquetas en el sitio de una pared de vaso dañada.

25 La estructura de los anticuerpos de un solo dominio, en particular, es única. Por ejemplo, las moléculas de VHH derivadas de anticuerpos de *Camelidae* se encuentran entre los dominios de unión a antígeno intactos más pequeños conocidos (de aproximadamente 15 kDa, o 10 veces más pequeños que una IgG convencional) y por tanto son muy idóneos para la administración a tejidos densos y para acceder al espacio limitado entre macromoléculas que participan en, o inician, el proceso de agregación mediada por plaquetas.

30 Que se sepa, esta es la primera vez que experimentos muestran que el pequeño tamaño de un VHH es ventajoso con respecto a un anticuerpo intacto grande para la inhibición de interacciones entre tales macromoléculas grandes.

A pesar del pequeño tamaño de los nanocuerpos, y por tanto las ventajas para la penetración, todavía es sorprendente que una molécula tan pequeña pueda inhibir interacciones entre polímeros grandes tales como vWF (de hasta 60 monómeros) y colágeno y con una eficacia tan alta. Se ha descrito que sólo las grandes formas multiméricas de vWF son hemostáticamente activas (Furlan, M. 1996, Ann. Hematol. 72:341-348). La unión de vWF multimérico a colágeno se produce con una afinidad ~100 veces mayor que la unión de fragmentos de vWF monoméricos.

40 Los resultados de los experimentos con alto cizallamiento indican que será necesaria una dosis menor para la administración a pacientes. Por tanto, se esperan menos efectos secundarios (tales como problemas de hemorragia o inmunogenicidad).

45 Un aspecto de la presente invención es proporcionar constructos polipeptídicos heteroespecíficos que modulan procesos que comprenden la agregación mediada por plaquetas tales como, por ejemplo, unión vWF-colágeno, adhesión vWF-receptor de plaquetas, adhesión colágeno-receptor de plaquetas, activación plaquetaria, unión de fibrinógeno y/o agregación plaquetaria. Dichos constructos polipeptídicos heteroespecíficos se derivan de anticuerpos de un solo dominio dirigidos contra vWF, dominios A1 o A3 de vWF, gplb o colágeno.

50 Los anticuerpos de un solo dominio anti-diana pueden dirigirse contra vWF entero, los dominios A1 o A3 de vWF, gplb o colágeno o un fragmento de los mismos, o un fragmento de una secuencia homóloga de los mismos.

55 Según un aspecto de la invención, una diana contra la que se dirige un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-diana fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica es factor de von Willebrand (vWF). Según otro aspecto de la invención, la diana es los dominios A1 o A3 de vWF. Según otro aspecto de la invención, la diana es gplb. Según otro aspecto de la invención, la diana es gplb/IIA. Según otro aspecto de la invención, la diana es colágeno.

60 Un aspecto de la presente invención se refiere a un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-vWF fusionados a uno o más VHH anti-proteína sérica, correspondiendo las secuencias de dicho polipéptido heteroespecífico a cualquiera de SEQ ID NO: 19 a 21. Los anticuerpos de un solo dominio anti-vWF en el mismo se derivan de anticuerpos de cadena pesada (VHH) de *Camelidae*, que se unen a vWF.

65 Una realización de la presente invención es un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-diana fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica diana, en el que la diana es cualquiera de vWF, los dominios A1 o A3 de vWF, gplb o colágeno para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de trastornos o estados relacionados con la agregación

mediada por plaquetas o la disfunción de la misma. Dichos trastornos incluyen ataque cerebral isquémico transitorio, angina de pecho inestable, infarto cerebral, infarto de miocardio, enfermedad oclusiva arterial periférica, reestenosis. Dichos estados incluyen los que surgen de injerto de revascularización coronaria, valvuloplastia de arteria coronaria e intervenciones coronarias tales angioplastia, colocación de endoprótesis o aterectomía.

5 Un aspecto es un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-diana fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica, en el que la diana es cualquiera de vWF, los dominios A1 o A3 de vWF o colágeno para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de trastornos o estados relacionados con la agregación mediada por plaquetas o la disfunción de la misma, en el que dicho constructo polipeptídico heteroespecífico se administra por vía intravenosa, por vía oral, por vía sublingual, de manera tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inhalación.

10 Otro aspecto es el uso de un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-diana fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica diana, en el que la diana es cualquiera de vWF, los dominios A1 o A3 de vWF o colágeno para la preparación de un medicamento para el tratamiento, la prevención y/o el alivio de trastornos o estados relacionados con la agregación mediada por plaquetas o la disfunción de la misma, en el que dicho constructo polipeptídico heteroespecífico se administra por vía intravenosa, por vía oral, por vía sublingual, de manera tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inhalación.

15 Otro aspecto es un método de tratamiento, prevención y/o alivio de trastornos o estados relacionados con la agregación mediada por plaquetas o la disfunción de la misma, que comprende administrar a un sujeto un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-diana fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica diana, en el que la diana es cualquiera de vWF, los dominios A1 o A3 de vWF o colágeno, en el que dicho constructo polipeptídico heteroespecífico se administra por vía intravenosa, por vía oral, por vía sublingual, de manera tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inhalación.

20 Otro aspecto de la invención es un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-diana fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica, en el que la diana es cualquiera de vWF, los dominios A1 o A3 de vWF o colágeno para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de trastornos o estados relacionados con la agregación mediada por plaquetas o la disfunción de la misma.

25 Otro aspecto es un uso de un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-diana fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica, en el que la diana es cualquiera de vWF, los dominios A1 o A3 de vWF o colágeno para la preparación de un medicamento para el tratamiento, la prevención y/o el alivio de trastornos o estados relacionados con la agregación mediada por plaquetas o la disfunción de la misma.

30 Un aspecto de la invención es que los VHH anti-vWF, anti-A1 de vWF o anti-A3 de vWF o anti-colágeno de la presente invención pueden derivarse de VHH de cualquier clase. Por ejemplo, pueden derivarse de la clase de VHH con alta homología con la secuencia de VH humana, o pueden derivarse de cualquiera de las otras clases de VHH, incluyendo la clase principal de VHH. Estos VHH incluyen los dominios VHH de *Camelidae* de longitud completa y pueden comprender un dominio de Fc humano si son necesarias funciones efectoras.

35 Los aspectos y las realizaciones anteriores se aplican a un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-vWF en el que dicho polipéptido heteroespecífico corresponde a una secuencia representada por cualquiera de SEQ ID NO: 19 a 21, una secuencia homóloga de la misma, una parte funcional de la misma o una secuencia homóloga de una parte funcional de la misma. SEQ ID NO: 19 a 21 comprenden VHH anti-vWF y VHH anti-albúmina sérica de ratón.

40 Los aspectos y las realizaciones anteriores se aplican a un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-diana fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica, en el que la diana es cualquiera de vWF, los dominios A1 o A3 de vWF, gpIb o colágeno y en el que dichos anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica corresponden a SEQ ID NO: 1, una secuencia homóloga de la misma, tal como se define en las reivindicaciones.

45 Durante su vida, los sujetos pueden desarrollar una respuesta alérgica frente a parásitos inofensivos (por ejemplo, *Dermatophagoides pteronyssinus*, ácaro del polvo doméstico) o sustancias (masas de microorganismos, plásticos, metales). Esto da como resultado la inducción de moléculas de IgE que inician una cascada de respuestas inmunológicas. Un aspecto de la presente invención es un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-IgE, impidiendo dicho constructo polipeptídico heteroespecífico la interacción de IgE con su(s) receptor(es) en mastocitos y basófilos. Como tales, impiden la iniciación de la cascada inmunológica, una reacción alérgica.

Según un aspecto de la invención, una diana contra la que se dirige un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-diana fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica es IgE. Dichos anticuerpos pueden dirigirse contra IgE entera o un fragmento de la misma, o un fragmento de una secuencia homóloga de la misma.

5 Un aspecto se refiere a un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-IgE fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica, en el que las secuencias de dicho polipéptido heteroespecífico corresponden a cualquiera de SEQ ID NO: 22 a 24. Los anticuerpos de un solo dominio anti-IgE en el mismo se derivan de anticuerpos de cadena pesada (VHH) de *Camelidae*, que se unen a IgE.

Los anticuerpos de un solo dominio anti-diana pueden dirigirse contra IgE-alfa entera o un fragmento de la misma, o un fragmento de una secuencia homóloga de la misma.

15 Una realización es un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-IgE fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de trastornos relacionados con alergias. Dichos trastornos comprenden una amplia gama de enfermedades mediadas por IgE tales como fiebre del heno, asma, dermatitis atópica, reacciones alérgicas de la piel, reacciones alérgicas oculares y alergias alimentarias.

20 Un aspecto es un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-IgE fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de trastornos relacionados con alergias, en el que dicho VHH se administra por vía intravenosa, por vía oral, por vía sublingual, de manera tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inhalación.

25 Otro aspecto es el uso de un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-IgE fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica para la preparación de un medicamento para el tratamiento, la prevención y/o el alivio de trastornos relacionados con alergias, en el que dicho constructo polipeptídico heteroespecífico se administra por vía intravenosa, por vía oral, por vía sublingual, de manera tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inhalación.

30 Otro aspecto es un método de tratamiento, prevención y/o alivio de trastornos relacionados con alergias, que comprende administrar a un sujeto un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-IgE fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica por vía intravenosa, por vía oral, por vía sublingual, de manera tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inhalación.

35 Otro aspecto es un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-IgE fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica para su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento, la prevención y/o el alivio de trastornos relacionados con alergias.

40 Otro aspecto es un uso de un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-IgE fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica para la preparación de un medicamento para el tratamiento, la prevención y/o el alivio de trastornos relacionados con alergias.

45 Un aspecto es que los anticuerpos de un solo dominio anti-IgE de la presente invención pueden derivarse de VHH de cualquier clase. Por ejemplo, pueden derivarse de una clase de VHH con alta homología con la secuencia de VH humana, o pueden derivarse de cualquiera de las otras clases de VHH, incluyendo la clase principal de VHH. Dichos VHH pueden derivarse de *Camelidae*. Estos VHH incluyen los dominios VHH de *Camelidae* de longitud completa y pueden comprender un dominio de Fc humano si son necesarias funciones efectoras.

50 Los aspectos y las realizaciones anteriores se aplican a un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-IgE fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica, en el que los polipéptidos heteroespecíficos corresponden a una secuencia representada por cualquiera de SEQ ID NO: 22 a 24, una secuencia homóloga de la misma, una parte funcional de la misma o una secuencia homóloga de una parte funcional de la misma. SEQ ID NO: 22 a 24 comprenden VHH de *Camelidae* anti-IgE y VHH de *Camelidae* anti-albúmina sérica de ratón.

55 Los aspectos y las realizaciones anteriores se aplican a un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-IgE fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica en el que dichos anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica corresponden a SEQ ID NO: 1 (VHH de *Camelidae* anti-proteína sérica), una secuencia homóloga de la misma, tal como se define en las reivindicaciones.

Por tanto, un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento reduce o previene una respuesta alérgica debida a alérgenos comunes o poco habituales. Además, el constructo tiene una duración prolongada en la sangre aumentando así la ventana terapéutica.

5 Se cree que el interferón-gamma (IFN-gamma) desempeña un papel importante en diversos trastornos, por ejemplo, en trastornos inflamatorios tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, esclerosis múltiple y reacciones hiperinmunitarias en el ojo. También se ha mostrado que IFN-gamma desempeña un papel significativo en la patología de enfermedades autoinmunitarias. Por ejemplo, la presencia de IFN-gamma se ha implicado en artritis reumatoide (Brennan *et al*, Brit. J. Rheum., 31, 293-8 (1992)).
10 Se han desarrollado varias estrategias para antagonizar la acción de estas citocinas y se usan actualmente para tratar diversos estados patológicos.

15 IFN-gamma en su forma bioactiva es un dímero y el surco formado por las dos subunidades es importante para su actividad biológica a través de la interacción con el receptor de IFN-gamma. Un inhibidor de IFN-gamma que tenga suficiente especificidad y selectividad frente a IFN-gamma puede ser un compuesto farmacéutico profiláctico o terapéutico eficaz para prevenir o tratar trastornos inflamatorios. Las enfermedades asociadas con IFN-gamma incluyen esclerosis múltiple, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis reumatoide juvenil y artritis psoriásica (documento US6.333.032 Advanced Biotherapy Concepts, Inc.). Otras enfermedades incluyen enfermedad de Crohn y psoriasis (documento US6.329.511 Protein Design Labs). Aún otras enfermedades son enfermedad del intestino, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn (documento EP0695189 Genentech).

25 Ninguno de los fármacos disponibles en la actualidad es completamente eficaz para el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria, y la mayor parte están limitados por una grave toxicidad. Además, desarrollar una nueva entidad química (NEQ) con suficiente potencia y selectividad frente a tal secuencia diana es un proceso extremadamente difícil y largo. Los agentes terapéuticos basados en anticuerpos tienen, por otro lado, un potencial significativo como fármacos porque tienen una especificidad exquisita para su diana y una baja toxicidad inherente. Además, puede reducirse considerablemente el tiempo de desarrollo en comparación con el desarrollo de nuevas entidades químicas (NEQ). Sin embargo, los anticuerpos convencionales son difíciles de producir contra proteínas multiméricas en las que el dominio de unión al receptor del ligando está incluido en un surco, como es el caso con IFN-gamma.
30

Los constructos polipeptídicos heteroespecíficos de la presente invención, en los que el anticuerpo de un solo dominio anti-diana se dirige contra TNF-alfa, superan los problemas experimentados usando agentes terapéuticos peptídicos de la técnica debido a las propiedades de la misma tal como estabilidad, tamaño y expresión fiable. Además, los inventores han encontrado que, a pesar de la presencia de un surco en IFN-gamma multimérico, los constructos polipeptídicos heteroespecíficos todavía pueden lograr una fuerte unión a IFN-gamma.
35

Según un aspecto, una diana contra la que se dirigen uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-diana de un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-diana fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica es interferón-gamma (IFN-gamma). Se secreta IFN-gamma por algunas células T. Además de su actividad antiviral, IFN-gamma estimula linfocitos citolíticos naturales (NK) y células T auxiliares 1 (Th1), y activa macrófagos y estimula la expresión de moléculas de CMH en la superficie de células. Por tanto, IFN-gamma sirve generalmente para potenciar muchos aspectos de la función inmunitaria, y es un candidato para el tratamiento de trastornos en los que el sistema inmunitario es hiperactivo por ejemplo, enfermedad de Crohn, trastornos autoinmunitarios y rechazo de trasplante de órganos además de trastornos inflamatorios tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y esclerosis múltiple.
40
45

Un aspecto se refiere a un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-IFN-gamma fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica, correspondiendo las secuencias de dicho polipéptido heteroespecífico a cualquiera de SEQ ID NO: 25 a 27. Los anticuerpos de un solo dominio anti-IFN-gamma en el mismo se derivan de anticuerpos de cadena pesada (VHH) de *Camelidae*, que se unen a IFN-gamma.
50

Los anticuerpos de un solo dominio anti-diana pueden dirigirse contra IFN-gamma entero o un fragmento del mismo, o un fragmento de una secuencia homóloga del mismo.
55

Una realización es un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-IFN-gamma fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de los trastornos en los que el sistema inmunitario es hiperactivo, tal como se mencionó anteriormente. La terapia actual consiste en la administración intravenosa de anticuerpos anti-IFN-gamma. La administración oral de estos constructos polipeptídicos heteroespecíficos da como resultado la administración de tales moléculas en una forma activa en el colon en sitios que están afectados por el trastorno. Estos sitios están sumamente inflamados y contienen células productoras de IFN-gamma. Estos constructos polipeptídicos heteroespecíficos pueden neutralizar el IFN-gamma localmente, evitando la distribución por todo el cuerpo y limitando por tanto los efectos secundarios negativos. Microorganismos modificados genéticamente tales como *Micrococcus lactis* pueden secretar fragmentos de anticuerpos. Tales microorganismos
60
65

modificados pueden usarse como vehículos para la producción local y la administración de fragmentos de anticuerpos en el intestino. Usando una cepa que produce un constructo polipeptídico heteroespecífico neutralizante de IFN-gamma, podrá tratarse un trastorno inflamatorio del intestino.

5 Otro aspecto es un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-IFN-gamma fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica para su uso en el tratamiento, la prevención y/o el alivio de trastornos en los que el sistema inmunitario es hiperactivo, en el que dicho constructo polipeptídico heteroespecífico se administra por vía intravenosa, por vía oral, por vía sublingual, de manera tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inhalación.

10 Otro aspecto es el uso de un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-IFN-gamma fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica para la preparación de un medicamento para el tratamiento, la prevención y/o el alivio de trastornos en los que el sistema inmunitario es hiperactivo, en el que dicho constructo polipeptídico heteroespecífico se administra por vía intravenosa, por vía oral, por vía sublingual, de manera tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inhalación.

15 Otro aspecto es un método de tratamiento, prevención y/o alivio de trastornos en los que el sistema inmunitario es hiperactivo, que comprende administrar a un sujeto un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-IFN-gamma fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica por vía intravenosa, por vía oral, por vía sublingual, de manera tópica, por vía nasal, por vía vaginal, por vía rectal o mediante inhalación.

20 Otro aspecto es un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-IFN-gamma unidos a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica para su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento, la prevención y/o el alivio de trastornos en los que el sistema inmunitario es hiperactivo.

25 Otro aspecto es un uso de un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-IFN-gamma fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica para su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento, la prevención y/o el alivio de trastornos en los que el sistema inmunitario es hiperactivo.

30 Un aspecto es que los anticuerpos de un solo dominio anti-IFN-gamma de la presente invención pueden derivarse de VHH de cualquier clase. Por ejemplo, pueden derivarse de una clase de VHH con alta homología con la secuencia de VH humana, o pueden derivarse de cualquiera de las otras clases de VHH, incluyendo la clase principal de VHH. Estos VHH incluyen los dominios VHH de *Camelidae* de longitud completa y pueden comprender un dominio de Fc humano si son necesarias funciones efectoras.

35 El aspecto y las realizaciones anteriores se aplican a un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más VHH anti-IFN-gamma fusionados a uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-proteína sérica en el que dicho polipéptido heteroespecífico corresponde a una secuencia representada por cualquiera de SEQ ID NO: 25 a 27, una secuencia homóloga de la misma, una parte funcional de la misma o una secuencia homóloga de una parte funcional. SEQ ID NO: 25 a 27 comprenden VHH anti-IFN-gamma y VHH anti-albúmina sérica de ratón.

40 Los aspectos y las realizaciones anteriores se aplican a un constructo polipeptídico heteroespecífico que comprende uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-IFN-gamma fusionados a uno o más VHH anti-proteína sérica en el que dichos VHH anti-proteína sérica corresponden a SEQ ID NO: 1, una secuencia homóloga de la misma, tal como se define en las reivindicaciones.

45 Una realización de la presente invención es un clon recombinante que comprende ácido nucleico que codifica para un constructo polipeptídico heteroespecífico según la invención. En un aspecto de la invención, dicho ácido nucleico codifica para uno o más anticuerpos de un solo dominio cada uno dirigido contra un antígeno diana terapéutico o de diagnóstico y uno o más anticuerpos de un solo dominio dirigidos contra una proteína sérica, dichos anticuerpos de un solo dominio ligados sin ligadores intermedios, o con una o más secuencias de ligador peptídico. Según un aspecto de la invención, una secuencia de ligador es cualquier secuencia de ligador adecuada conocida en la técnica. Según otro aspecto de la invención, una secuencia de ligador es una secuencia que se produce de manera natural. Propiedades preferidas de las secuencias de ligadores son que no son inmunogénicas o no son significativamente inmunogénicas, pueden proporcionar suficiente flexibilidad al constructo polipeptídico heteroespecífico, y son resistentes a la degradación proteolítica. Un ejemplo de un ligador según la invención es el dado a conocer en el documento PCT/EP96/01725 que se deriva de la región bisagra de VHH.

50 Según otro aspecto de la invención, un clon comprende ácido nucleico que codifica para un polipéptido correspondiente a una secuencia representada por SEQ ID NO: 1, una secuencia homóloga de la misma, tal como se define en las reivindicaciones, y ácido nucleico que codifica para uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-diana, una secuencia homóloga del mismo, una parte funcional del mismo o una secuencia homóloga de una parte

funcional del mismo.

5 Según otro aspecto, un clon comprende ácido nucleico que puede codificar para un polipéptido correspondiente a una secuencia representada por cualquiera de SEQ ID NO: 5 a 27, una secuencia homóloga de la misma, una parte funcional de la misma o una secuencia homóloga de una parte funcional de la misma.

Está dentro del alcance de la invención que esté presente ácido nucleico que codifica para múltiples VHH anti-diana y/o múltiples VHH anti-proteína sérica en un clon de la invención.

10 Mediante la transformación de un huésped compatible con un clon que codifica para un constructo polipeptídico heteroespecífico de la invención, el constructo polipeptídico heteroespecífico puede producirse en cantidades suficientes para su uso en terapia. Los ejemplos de organismos en los que puede transformarse dicho clon incluyen, pero no se limitan a, *E. coli* o *Saccharomyces cerevisiae*.

15 Otra realización de la presente invención es un método para prolongar la semivida de un VHH anti-diana que comprende la etapa de unir al mismo uno o más anticuerpos de un solo dominio anti-albúmina sérica. Tal como ya se mencionó anteriormente, se conocen en la técnica métodos para la unión o pueden ser cualquier método futuro, por ejemplo, pueden fusionarse mediante acoplamiento químico, fusionarse a nivel del ADN, etc.

20 El tratamiento, la prevención y/o el alivio de los síntomas de uno o más de los trastornos mencionados en el presente documento implican generalmente administrar a un sujeto una "cantidad terapéuticamente eficaz" de constructo polipeptídico heteroespecífico. Por "cantidad terapéuticamente eficaz", "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" quiere decirse la cantidad necesaria para lograr el resultado o los resultados deseados. Un experto habitual en la técnica reconocerá que la potencia y, por tanto, una "cantidad eficaz", puede variar para los diversos compuestos que inhiben una ruta del trastorno usados en la invención. Un experto en la técnica puede evaluar fácilmente la potencia del compuesto.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "compuesto" se refiere a un constructo polipeptídico heteroespecífico tal como se da a conocer en el presente documento, un polipéptido representado por SEQ ID NO: 5 a 27, una secuencia homóloga del mismo, o un homólogo del mismo, o un ácido nucleico que puede codificar para dicho polipéptido.

30 Por "farmacéuticamente aceptable" quiere decirse un material que es no es no deseado biológicamente o de otro modo, es decir, el material puede administrarse a un individuo junto con el compuesto sin provocar ningún efecto biológico no deseado ni interactuar de manera perjudicial con ninguno de los demás componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

35 La invención dada a conocer en el presente documento es útil para tratar o prevenir un estado relacionado con un trastorno tal como se menciona en el presente documento (por ejemplo, alergia y/o inflamación), en un sujeto y que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto o una composición que se une a un componente implicado en la ruta del trastorno (por ejemplo, a IgE y/o TNF-alfa en el torrente sanguíneo), inhibiendo así la ruta del trastorno y el trastorno.

40 Un aspecto es el uso de compuestos de la invención para tratar o prevenir un estado relacionado con un trastorno tal como se menciona en el presente documento (por ejemplo, alergia y/o inflamación), en un sujeto y que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto en combinación con otro, tal como, por ejemplo, aspirina.

45 La presente invención no se limita a la administración de formulaciones que comprenden un único compuesto de la invención. Está dentro del alcance de la invención proporcionar tratamientos de combinación en los que a un paciente que lo necesita se le administra una formulación que comprende más de un compuesto de la invención.

50 Se conoce bien en la técnica cómo determinar la inhibición de la ruta de un trastorno usando las pruebas convencionales descritas en el presente documento, o usando otras pruebas similares. Preferiblemente, el método dará como resultado una reducción de al menos el 10% en un indicador del trastorno, incluyendo, por ejemplo, el 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, o cualquier cantidad entremedia, más preferiblemente en el 90%. Por ejemplo, una inhibición de una ruta alérgica mediante la inhibición de IgE por un péptido de la invención podrá dar como resultado una reducción del 10% en los niveles de IgE específicos de alimentos.

55 El compuesto útil en la presente invención puede formularse como composiciones farmacéuticas y administrarse a un huésped mamífero, tal como un paciente humano o cualquier animal, en una variedad de formas adaptadas a la vía de administración elegida, es decir, por vía oral o por vía parenteral, por vía intranasal mediante inhalación, vías intravenosa, intramuscular, tópica o subcutánea.

60 El compuesto de la presente invención también puede administrarse usando métodos de administración de terapia

génica. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.399.346, que se incorpora como referencia en su totalidad. Usando un método de administración de terapia génica, pueden transfectarse adicionalmente células primarias transfectadas con el gen para el compuesto de la presente invención, con promotores específicos de tejido para seleccionar como diana órganos, tejido, injertos, tumores o células específicos.

Por tanto, el presente compuesto puede administrarse de manera sistémica, por ejemplo, por vía oral, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. Puede encerrarse en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, puede someterse a compresión para dar comprimidos o puede incorporarse directamente con los alimentos de la dieta del paciente. Para la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede combinarse con uno o más excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener al menos el 0,1% de compuesto activo. Por supuesto, el porcentaje de las composiciones y preparaciones puede variarse y puede ser de manera conveniente de entre aproximadamente el 2 y aproximadamente el 60% del peso de una forma de dosificación unitaria dada. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtiene un nivel de dosificación eficaz.

Los comprimidos, trociscos, pastillas, cápsulas y similares pueden contener lo siguiente: aglutinantes tales como goma tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato de dicalcio; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, fructosa, lactosa o aspartamo o puede añadirse un agente aromatizante tal como menta piperita, aceite de gaulteria o aromatizante de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un portador líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Otros diversos materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo, comprimidos, pastillas o cápsulas pueden recubrirse con gelatina, cera, goma laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa o fructosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y aromatizante tal como aroma de cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo puede incorporarse en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.

El compuesto activo también puede administrarse por vía intravenosa o por vía intraperitoneal mediante infusión o inyección. Pueden prepararse disoluciones del compuesto activo o sus sales en agua, opcionalmente mezclada con un tensioactivo no tóxico. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina y mezclas de los mismos y en aceites. En las condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

Las formas de dosificación farmacéuticas adecuadas para inyección o infusión pueden incluir disoluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el principio activo que están adaptados para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables o infundibles estériles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. En todos los casos, la forma de dosificación final debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El portador o vehículo líquido puede ser un disolvente o medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos, y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones o mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede provocarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro de sodio. Puede provocarse la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se preparan disoluciones inyectables estériles mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de lo demás componentes enumerados anteriormente, según se requiere, seguido por esterilización por filtración. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado a vacío y de liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional presente en las disoluciones esterilizadas por filtración previamente.

Para la administración tópica, el presente compuesto puede aplicarse en forma pura, es decir, cuando son líquidos. Sin embargo, generalmente será deseable administrarlos a la piel como composiciones o formulaciones, en combinación con un portador dermatológicamente aceptable, que puede ser un sólido o un líquido.

Los portadores sólidos útiles incluyen sólidos finamente divididos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Los portadores líquidos útiles incluyen agua, hidroxialquilos o glicoles o mezclas agua-

alcohol/glicol, en los que puede disolverse o dispersarse el presente compuesto a niveles eficaces, opcionalmente con la ayuda de tensioactivos no tóxicos. Pueden añadirse adyuvantes tales como fragancias y agentes antimicrobianos adicionales para optimizar las propiedades para un uso dado. Las composiciones líquidas resultantes pueden aplicarse desde almohadillas absorbentes, usadas para impregnar vendas y otros apósitos, o pulverizarse sobre la zona afectada usando pulverizadores de tipo bomba o de aerosol.

También pueden emplearse espesantes tales como polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales y ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales minerales modificados, con portadores líquidos para formar pastas extensibles, geles, pomadas, jabones y similares, para la aplicación directamente a la piel del usuario.

En la técnica se conocen ejemplos de composiciones dermatológicas útiles que pueden usarse para administrar el compuesto a la piel; por ejemplo, véanse Jacquet *et al.* (patente estadounidense n.º 4.608.392), Geria (patente estadounidense n.º 4.992.478), Smith *et al.* (patente estadounidense n.º 4.559.157) y Wortzman (patente estadounidense n.º 4.820.508).

Pueden determinarse dosificaciones útiles del compuesto mediante la comparación de su actividad *in vitro* y la actividad *in vivo* en modelos de animales. En la técnica se conocen métodos para la extrapolación de dosificaciones eficaces en ratones, y otros animales, a seres humanos; por ejemplo, véase la patente estadounidense n.º 4.938.949.

Generalmente, la concentración del/de los compuesto(s) en una composición líquida, tal como una loción, será de aproximadamente el 0,1-25% en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,5-10% en peso. La concentración en una composición semisólida o sólida tal como un gel o un polvo será de aproximadamente el 0,1-5% en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,5-2,5% en peso.

La cantidad del compuesto, o una sal activa o derivado del mismo, requerida para su uso en tratamiento variará no sólo con la sal particular seleccionada sino también con la vía de administración, la naturaleza del estado que esté tratándose y la edad y el estado del paciente y será en última instancia a criterio del médico o médico clínico encargado. La dosificación del compuesto también varía dependiendo de la célula, el tumor, el tejido, el injerto o el órgano diana.

La dosis deseada puede presentarse de manera conveniente en una única dosis o en dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis al día. La propia subdosis puede dividirse adicionalmente, por ejemplo, en varias administraciones diferenciadas espaciadas sin demasiado rigor; tales como múltiples inhalaciones desde un insufador o mediante la aplicación de una pluralidad de gotas en el ojo.

Un régimen de administración podrá incluir el tratamiento diario, a largo plazo. Por "a largo plazo" quiere decirse al menos dos semanas y preferiblemente, varias semanas, meses o años de duración. Un experto habitual en la técnica puede determinar modificaciones necesarias en este intervalo de dosificación usando sólo experimentación de rutina dadas las enseñanzas en el presente documento. Véase Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA. También puede ajustarse la dosificación por el médico individual en el caso de cualquier complicación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Inmunización de llamas

Se inmunizó una llama con albúmina sérica humana (HSA). En la tabla 1 se resume el esquema de inmunización.

Ejemplo 2: Clonación de repertorio

Se aislaron linfocitos de sangre periférica (PLB) mediante centrifugación en un gradiente de densidad (Ficoll-Paque Plus Amersham Biosciences). Se usaron los PBL para extraer ARN total (Chomczynski y Sacchi 1987). Se preparó ADNc en 100 µg de ARN total con transcriptasa inversa de VLMM (Gibco BRL) usando oligonucleótidos oligo d(T). Se purificó el ADNc con una extracción con fenol/cloroformo, seguido por una precipitación con etanol y posteriormente se usó como molde para amplificar el repertorio de VHH.

En una primera PCR, se amplificó el repertorio de segmentos génicos de anticuerpos tanto convencionales (1,6 kb) como de cadena pesada (1,3 kb) usando un cebador específico líder (5' - GGCTGAGCTCGGTGGTCCTGGCT- 3') y el cebador de oligo d(T) (5'- AACTGGAAGAATTCGCGGCCGCAGGAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'). Se separaron los fragmentos de ADN resultantes mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificó del gel de agarosa el fragmento de 1,3 kb, que codifica para segmentos de anticuerpo de cadena pesada. Se realizó una segunda PCR usando una mezcla de cebadores inversos de FR1 y el mismo cebador directo de oligo d(T). Se digirieron los productos de PCR con *Sfi*I (introducido en el cebador de FR1) y *Bst*EII (que se produce de manera natural en FR4). Tras la electroforesis en gel, se purificó del gel el fragmento de ADN de aproximadamente 400 pares de bases y se ligó en los sitios de restricción correspondientes del fagémido pAX004 para obtener una biblioteca de VHH clonados

tras electroporación de *Escherichia coli* TG1. El tamaño de la biblioteca era de $1,4 \times 10^7$ ufc, y todos los clones contenían el inserto del tamaño correcto.

Ejemplo 3: Rescate de la biblioteca, preparación en fago

5 Se hizo crecer la biblioteca a 37°C en 10 ml de medio 2xTY que contenía glucosa al 2% y ampicilina 100 µg/ml, hasta que la DO600nm alcanzó 0,5. Se añadieron fagos M13KO7 (10^{12}) y se incubó la mezcla a 37°C 2 veces durante 30 minutos, en primer lugar sin agitación, luego con agitación a 100 rpm. Se centrifugaron las células durante 10 minutos a 4500 rpm a temperatura ambiente. Se resuspendió el sedimento bacteriano en 50 ml de medio 10 2xTY que contenía ampicilina 100 µg/ml y kanamicina 25 µg/ml, y se incubó durante la noche a 37°C con agitación vigorosa a 250 rpm. Se centrifugaron los cultivos durante la noche durante 15 minutos a 10.000 rpm a 4°C. Se precipitaron con PEG los fagos (polietilenglicol al 20% y NaCl 1,5 M) y se centrifugaron durante 30 minutos a 10.000 rpm. Se resuspendió el sedimento en 20 ml de PBS. Se precipitaron con PEG los fagos de nuevo y se 15 centrifugaron durante 30 minutos a 20.000 rpm y 4°C. Se disolvió el sedimento en 5 ml de PBS-caseína al 1%. Se titularon los fagos mediante infección de células TG1 a DO600nm= 0,5 y se sembraron sobre placas de LB-agar que contenían ampicilina 100 µg/ml y glucosa al 2%. El número de transformantes indica el número de fagos (= ufp). Se almacenaron los fagos a -80°C con glicerol al 15%.

Ejemplo 4: ELISA de fago

20 Se recubrió una placa de microtitulación (Maxisorp) durante la noche a 4°C con PBS-caseína al 1% o con HSA 5 µg/ml (albúmina sérica humana). Se lavó la placa 3 veces con PBS-Tween (Tween20 al 0,05%) y se bloqueó durante 2 horas a temperatura ambiente con 200 µl de PBS-caseína al 1%. Se lavó la placa cinco veces con PBS-Tween. Se prepararon los fagos tal como se describió anteriormente y se aplicaron a los pocillos en diluciones 25 dobles consecutivas. Se lavaron las placas cinco veces con PBS-Tween. Se detectaron los fagos unidos con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-M13 conjugado con peroxidasa del rábano (HRP) diluido 1/2000 en PBS. Se lavaron las placas cinco veces con PBS-Tween. Se realizó la tinción con ABTS/H₂O₂ y se midieron las señales tras 30 minutos a 405 nm. En la figura 1 se muestran los resultados e indican la presencia de nanocuerpos específicos de HSA en la biblioteca.

Ejemplo 5: Selección: primera y segunda tanda de cribado biológico

30 Se recubrió un pocillo en una placa de microtitulación con albúmina sérica de ratón 10 µg/ml (MSA) o con PBS que contenía caseína al 1%. Tras incubación durante la noche a 4°C, se bloquearon los pocillos con PBS que contenía 35 caseína al 1%, durante 3 horas a temperatura ambiente (TA). Se añadieron 200 µl de fagos a los pocillos. Tras incubación durante 2 horas a TA, se lavaron los pocillos 10 veces con PBS-Tween y 10 veces con PBS. Se eluyeron los fagos unidos con 100 µl de tampón glicina 0,2 M, pH= 2,4. Se realizaron las eluciones durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se permitió que los fagos eluidos infectasen células de *E. coli* TG1 con crecimiento exponencial, y luego se sembraron en placas de LB-agar que contenían ampicilina 100 µg/ml y glucosa al 2%. Se realizó una segunda tanda con las mismas condiciones tal como se describió anteriormente. En la tabla 2 se 40 resumen los resultados.

Ejemplo 6: Examen de clones individuales tras el cribado biológico

45 ELISA: unión a albúmina sérica humana (HSA) y albúmina sérica de ratón (MSA)

Se usó una colonia individual para iniciar un cultivo durante la noche en LB que contenía glucosa al 2% y ampicilina 100 µg/ml. Se diluyó este cultivo durante la noche 100 veces en medio TB que contenía ampicilina 100 µg/ml, y se incubó a 37°C hasta DO600nm= 0,5. Se añadió IPTG 1 mM y se incubó el cultivo durante 3 horas más a 37°C o 50 durante la noche a 28°C. Se centrifugaron los cultivos durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C. Se congeló el sedimento durante la noche o durante 1 hora a -20°C. A continuación, se descongeló el sedimento a temperatura ambiente durante 40 minutos, se resuspendió en PBS y se agitó en hielo durante 1 hora. Se aisló la fracción periplasmática mediante centrifugación durante 20 minutos a 4°C a 20.000 rpm. Se usó el sobrenadante que contenía los VHH para análisis adicional.

55 Se recubrió una placa de microtitulación con HSA 5 µg/ml, con albúmina sérica de ratón 5 µg/ml (MSA) o con PBS-caseína al 1%, durante la noche a 4°C. Se bloquearon las placas durante dos horas a temperatura ambiente con 300 µl de caseína al 1% en PBS. Se lavaron las placas tres veces con PBS-Tween. Se preparó la fracción periplasmática para 23 clones individuales tras la primera y segunda tanda de selección, y se permitió que se uniera a los pocillos de la placa de microtitulación. Se lavaron las placas seis veces con PBS-Tween; tras lo cual se detectó la unión de nanocuerpo mediante incubación con anticuerpo monoclonal de ratón anti-histidina Serotec MCA 1396 (dilución 1/1000) en PBS durante 1 hora a TA seguido por conjugado de anticuerpo anti-ratón-fosfatasa alcalina 60 1/2000 en PBS, también durante 1 hora a TA. Se realizó la tinción con el sustrato PNPP (fosfato de p-nitrofenilo, 2 mg/ml en dietanolamina 1 M, Mg₂SO₄ 1 mM, pH 9,8) y se midieron las señales tras 30 minutos a 405 nm. En la tabla 65 3 se resumen los resultados.

Ejemplo 7: Patrón y secuenciación de Hinfl

Se realizó una PCR con clones positivos tras la segunda tanda de cribado, con un conjunto de cebadores que se unen a una secuencia en el vector. Se digirió el producto de PCR con la enzima de restricción Hinfl y se cargó en un gel de agarosa. Se seleccionaron 4 clones con un patrón de Hinfl diferente para evaluación adicional. Se secuenciaron esos clones, y en la tabla 4 se resumen los resultados (SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4).

Ejemplo 8: Someter a prueba la reactividad cruzada con albúmina de diferentes especies

Se ejecutó una SDS-PAGE para plasma (dilución 1/10) de diferentes especies (babuino, cerdo, hámster, ser humano, rata, ratón y conejo) y se sometió a transferencia sobre una membrana de nitrocelulosa. Se prepararon los fagos para los clones MSA 21, MSA 24, MSA 210, MSA212 y un nanocuerpo de control tal como se describe en el ejemplo 3. Se permitió que los fagos se unieran a las albúminas séricas sometidas a transferencia en nitrocelulosa y se eliminaron por lavado los fagos no unidos. Se detectó la unión con un anticuerpo policlonal anti-M13 acoplado a HRP. Se usó DAP como sustrato para la detección. En la figura 2 se muestran los resultados.

A partir de estos resultados, puede concluirse que los 4 agentes de unión dan reacción cruzada entre albúmina sérica de cerdo, ser humano, ratón (menos para MSA212) y hámster. MSA 21 también da reacción cruzada con albúmina sérica de conejo. Con el nanocuerpo irrelevante, no se observó unión (no mostrado).

Como experimento de control, se ejecutó una SDS-PAGE con las diferentes muestras de plasma diluido 1/100 en PBS. Se tiñó el gel con Coomassie. Puede concluirse a partir de la figura 3 que los niveles de albúmina en todas las muestras de plasma son altos excepto para plasma de conejo, con bajos niveles de albúmina.

Ejemplo 9: Expresión y purificación

Se preparó plásmido para los agentes de unión y se transformó en células electrocompetentes WK6. Se usó una colonia individual para iniciar un cultivo durante la noche en LB que contenía glucosa al 2% y ampicilina 100 µg/ml. Se diluyó este cultivo durante la noche 100 veces en 300 ml de medio TB que contenía ampicilina 100 µg/ml, y se incubó a 37°C hasta DO600nm= 0,5. Se añadió IPTG 1 mM y se incubó el cultivo durante 3 horas más a 37°C o durante la noche a 28°C.

Se centrifugaron los cultivos durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C. Se congeló el sedimento durante la noche o durante 1 hora a -20°C. A continuación, se descongeló el sedimento a temperatura ambiente durante 40 minutos, se resuspendió en 20 ml de PBS y se agitó en hielo durante 1 hora. Se aisló la fracción periplasmática mediante centrifugación durante 20 minutos a 4°C a 20.000 rpm. Se cargó el sobrenadante que contenía el nanocuerpo en Ni-NTA y se purificó hasta homogeneidad.

Ejemplo 10: ELISA con MSA de los nanocuerpos purificados

Se recubrió una placa de microtitulación con MSA 5 µg/ml durante la noche a 4°C. Tras lavado, se bloqueó la placa durante 2 horas a TA con PBS-caseína al 1%. Se aplicaron las muestras por duplicado partiendo de una concentración de 2500 nM a diluciones 1/3 y se permitió que se unieran durante 2 horas a TA. Se añadió un suero de conejo policlonal anti-nanocuerpo a 1/1000 (K208) durante una hora a TA. La detección fue con conjugado de anticuerpo anti-conejo-fosfatasa alcalina a 1/1000 y tinción con PNPP tal como se describe en el ejemplo 6. En la figura 4 se muestran los resultados.

Ejemplo 11: Construcción de constructos biespecíficos

Se construyó el vector de producción de *E. coli* pAX11 para permitir la clonación en dos etapas de VHH bivalente o biespecífico (figura 5).

Se clonó el VHH carboxilo-terminal en primer lugar con PstI y BstEII, mientras que en la segunda etapa se insertó el otro VHH mediante SfiI y NotI, que no cortan dentro del primer fragmento génico. El procedimiento evita la aplicación de nuevos sitios mediante amplificación y por tanto el riesgo de introducir errores de PCR. Se usó la región bisagra central de llama como ligador entre los nanocuerpos. Se clonó un VHH contra TNF-alfa humano en el COOH terminal de nanocuerpos específicos de MSA. En la tabla 4 se resumen las secuencias (SEQ ID NO: 5, 6, 7 y 8). Se preparó plásmido y se transformó en células electrocompetentes WK6. Se usó una colonia individual para iniciar un cultivo durante la noche en LB que contenía glucosa al 2% y ampicilina 100 µg/ml. Se diluyó este cultivo durante la noche 100 veces en 300 µl de medio TB que contenía ampicilina 100 mg/ml, y se incubó a 37°C hasta DO600nm = 0,5. Se añadió IPTG 1 mM y se incubó el cultivo durante 3 horas más a 37°C.

Se centrifugaron los cultivos durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C. Se congeló el sedimento durante la noche a -20°C. A la mañana siguiente, se descongeló el sedimento en la sala fría durante 40 minutos, se resuspendió en 20 ml de PBS y se agitó en hielo durante 1 hora. Se aisló la fracción periplasmática mediante centrifugación durante

20 minutos a 4°C a 10.000 rpm. Se cargó el sobrenadante en Ni-NTA y se purificó hasta homogeneidad. En la tabla 4 se muestran las secuencias (SEQ ID NO: 5, 6, 7 y 8). Fue necesaria una etapa de purificación extra para eliminar cierto producto de degradación (5%) con filtración en gel.

5 En la tabla 4 se enumera otro VHH biespecífico contra TNF-alfa humano (MP7 12b) (SEQ ID NO: 15, 16, 17 y 18).

Ejemplo 12: Someter a prueba constructo biespecifico en ELISA de tipo sándwich

10 Se recubrió una placa de microtitulación con MSA 5 µg/ml durante la noche a 4°C. Se bloquearon las placas durante dos horas a temperatura ambiente con 300 µl caseína al 1% en PBS. Se lavaron las placas tres veces con PBS-Tween. Se permitió que la proteína purificada para los constructos biespecificos se uniera a los pocillos de la placa de microtitulación a una concentración de 0,4, 0,5, 2,5 y 2,5 µg/ml para MSA21, MSA24, MSA210 y MSA212 respectivamente. Se lavaron las placas seis veces con PBS-Tween. Se añadió TNF biotinilado a una concentración de 10 µg/ml y se diluyó 3 veces, y se permitió que se uniera durante 2 horas a temperatura ambiente. Se detectó la unión mediante incubación con conjugado de ratón-extravidina-fosfatasa alcalina (Sigma) 1/2000 en PBS, durante 15 1 hora a TA. Se realizó la tinción con el sustrato PNPP (fosfato de p-nitrofenilo, 2 mg/ml en dietanolamina 1 M, Mg₂SO₄ 1 mM, pH9,8) y se midieron las señales tras 30 minutos a 405 nm. En la figura 6 se muestran los resultados e indican que el constructo biespecifico puede unirse a ambos antígenos simultáneamente.

Ejemplo 13: Determinar la afinidad de agentes de unión a albúmina en BIACORE

20 Se determinaron las afinidades para albúmina de ratón en BIACORE mediante la inmovilización de albúmina de ratón en un chip CM5 BIAcore usando acoplamiento covalente con EDC-NHS y se resumen en la tabla 5. Los resultados indican que la afinidad para albúmina se conserva en el constructo biespecifico.

25

Ejemplo 14: Optimización de ELISA en plasma o sangre

30 Se iniciaron experimentos farmacocinéticos para comparar la semivida en ratones del agente de unión de TNF-alfa, TNF3E, con MSA21/VHH#3E y MSA24/VHH#3E. Por tanto este ELISA tuvo que optimizarse para obtener bajos niveles de fondo cuando las muestras son en sangre o en plasma. Se recubrió una placa de microtitulación con neutravidina. Tras incubación durante la noche a 4°C, se lavaron las placas y se bloquearon durante 2 horas a TA con PBS-caseína al 1%. Se permitió que TNF-alfa biotinilado 1 µg/ml durante 30 minutos a TA y se lavó la placa. Se aplicaron muestras (MSA21/VHH#3E y VHH#3E monovalente) partiendo de una concentración de 1 µg/ml diluidas en PBS, plasma al 10% o sangre al 10% y se permitió que se unieran durante 2 horas. Tras lavar las placas, se 35 añadió un antisuero de conejo a una dilución de 1/2000 que o bien reconocía la clase de cadena pesada (K208) o bien reconocía la clase convencional (URL49). Tras incubación durante 1 hora, se lavaron las placas y se añadió un conjugado de anticuerpo anti-conejo-fosfatasa alcalina (Sigma) a una dilución de 1/1000. Tras incubación durante 1 hora a TA, se lavaron las placas y se detectó la unión con sustrato. En la figura 7 se muestran los resultados. Los resultados muestran claramente que los valores de fondo con los antisueros de conejo (K208 y URL49) son muy 40 bajos cuando se diluyen las muestras en sangre al 10% o plasma al 10% en comparación con PBS. El antisuero URL49 sólo reconoce el nanocuerpo biespecifico MSA21NHH#3E y no el VHH#3E monovalente, por tanto, este antisuero puede usarse para someter a prueba la integridad de este nanocuerpo biespecifico tras la administración a los ratones.

Ejemplo 15: Expresión a gran escala y purificación de VHH#3E, M5A21/VHH#3E y MSA24/VHH#3E para estudios farmacocinéticos en ratones

45 Se inició un cultivo de 3 litros para TNF3E monovalente y para MSA21/VHH#3E o MSA24/VHH#3E biespecificos y se purificaron tal como se describe en el ejemplo 11. Fue necesaria una etapa de purificación extra para la eliminación de endotoxinas. Por tanto, se purificaron las muestras en una columna de polimixina (BIO-RAD). Se analizaron las muestras para determinar la concentración de endotoxinas bacterianas con el ensayo de LAL (lisado de amebocitos de *Limulus*, Bio Whittaker). En la tabla 6 se resumen los resultados.

Ejemplo 16: Farmacocinética en ratones

55

Se les inyectaron, a 9 ratones (OB57/BI6) para cada constructo, por vía intravenosa en la cola, 100 µg de nanocuerpo. Se recuperó sangre en diferentes puntos de tiempo (3 ratones por punto de tiempo) y se preparó suero. Se analizaron muestras mediante ELISA para determinar la presencia de nanocuerpo monovalente o biespecifico tal como se describe en el ejemplo 14. También se comparó K208 con URL49 para detectar los constructos biespecificos para verificar la integridad de la molécula. En las figuras 8 a 11 se muestran los resultados.

60

Puede concluirse a partir de los resultados que la semivida del nanocuerpo monovalente (40-45 minutos) mejora de manera espectacular al preparar un nanocuerpo biespecifico con especificidad para albúmina MSA2/NHH#3E y MSA24/VHH#3E (semivida de 2,5 a 3 días). El nanocuerpo biespecifico MSA21/VHH#3E permanece intacto incluso 65 tras 19 días en los ratones tal como se muestra en ELISA con URL49 (figura 11).

Ejemplo 17: Ampliación adicional de la semivida de nanocuerpos

Para aumentar la semivida de MSA21/TNF3E y MSA24/TNF3E incluso adicionalmente, se preparó un nanocuerpo trivalente mediante la fusión del constructo bivalente MSA21-MSA21 al nanocuerpo específico de diana TNF3E. Se sometió a prueba el MSA21/MSA21/TNF3E resultante (tabla 7 y SEQ ID NO: 9) *in vivo* según el método del ejemplo 16.

Ejemplo 18: Inmunización de la llama 002

Se inmunizó 1 llama con vWF. En la tabla 7 se resume el esquema de inmunización.

Ejemplo 19: Clonación de repertorio y preparación de fagos

Se preparó la biblioteca tal como se describe en el ejemplo 2. El tamaño de la biblioteca era de $1,4 \times 10^7$ ufc, y >90% de los clones contenían el inserto de tamaño correcto. Se prepararon los fagos tal como se describe en el ejemplo 3.

Ejemplo 20: Selección de agentes de unión para vWF que inhiben la interacción con colágeno: primera y segunda tanda de cribado

Se recubrió un pocillo en una placa de microtitulación con vWF 2 $\mu\text{g/ml}$ o con PBS que contenía caseína al 1%. Tras incubación durante la noche a 4°C, se bloquearon los pocillos con PBS que contenía caseína al 1%, durante 3 horas a TA. Se añadieron 200 μl de fagos a los pocillos. Tras incubación durante 2 horas a TA, se lavaron los pocillos 10 veces con PBS-Tween y 10 veces con PBS. Se eluyeron específicamente los fagos con 100 μl de colágeno tipo III 100 $\mu\text{g/ml}$. Se realizaron las eluciones durante la noche a temperatura ambiente. Se permitió que los fagos eluidos infectasen células TG1 con crecimiento exponencial, y luego se sembraron en placas de LB-agar que contenía ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ y glucosa al 2%. Se repitió este experimento para una segunda tanda de cribado, en las mismas condiciones tal como se describió anteriormente. En las tablas 8 y 9 se presentan los resultados del cribado.

Ejemplo 21: Caracterización funcional de agentes de unión de vWF: inhibición de la unión de vWF a colágeno mediante VHH

Se recubrió una placa de microtitulación durante la noche a 4°C con colágeno tipo III a 25 $\mu\text{g/ml}$ en PBS. Se lavó la placa cinco veces con PBS-Tween y se bloqueó durante 2 horas a temperatura ambiente con PBS que contenía caseína al 1%. Se lavó la placa cinco veces con PBS-Tween. Se mezclaron 100 μl de vWF 2 $\mu\text{g/ml}$ (se preincubó vWF a 37°C durante 15 minutos) con 20 μl de extracto periplasmático que contenía un anticuerpo VHH (descrito en el ejemplo 6) y se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente en los pocillos de la placa de microtitulación. Se lavó la placa cinco veces con PBS-Tween. Se diluyó un anticuerpo monoclonal anti-vWF-HRP (DAKO) 3.000 veces en PBS y se incubó durante 1 hora. Se lavó la placa cinco veces con PBS-Tween y se detectó la unión de vWF con ABTS/H₂O₂. Se midieron las señales tras 30 minutos a 405 nm. En la tabla 10 se presentan los resultados, mostrando qué inhibidores se obtienen tras la primera y la segunda tandas de cribado.

Ejemplo 22: Expresión y purificación de VHH

Se preparó la proteína y se purificó tal como se describe en el ejemplo 9.

Ejemplo 23: ELISA: unión a vWF

Se recubrió una placa de microtitulación con vWF 2 $\mu\text{g/ml}$, durante la noche a 4°C. Se bloquearon las placas durante dos horas a temperatura ambiente con 300 μl de caseína al 1% en PBS. Se lavaron las placas tres veces con PBS-Tween. Se incubaron series de dilución de todas las muestras purificadas durante 2 horas a TA. Se lavaron las placas seis veces con PBS-Tween, tras lo cual se detectó la unión de VHH mediante incubación con AcM de ratón anti-myc 1/2000 en PBS durante 1 hora a TA seguido por conjugado de anticuerpo anti-ratón-HRP 1/1000 en PBS, también durante 1 hora a TA. Se realizó la tinción con el sustrato ABTS/H₂O₂ y se midieron las señales tras 30 minutos a 405 nm. En la figura 12 se indica la unión en función de la concentración de VHH purificado.

Ejemplo 24: ELISA de inhibición con VHH purificado

Se realizó ELISA de inhibición tal como se describe en el ejemplo 20 pero con concentraciones decrecientes de VHH y con plasma humano a una dilución de 1/60 en lugar de con vWF purificado. En la figura 13 se representan los resultados. En la tabla 10 se proporciona la concentración de VHH que da como resultado una inhibición del 50% (CI50).

Ejemplo 25: Construcción y secuencia de constructos biespecíficos

Se prepararon constructos biespecíficos con el primer VHH específico para albúmina (MSA21) y el segundo VHH

específico para vWF. Se prepararon constructos tal como se describe en el ejemplo 11. En la tabla 4 se muestran las secuencias (SEQ ID NO: 19 a 21)

Ejemplo 26: Expresión y purificación de constructos biespecíficos

Se expresó la proteína y se purificó tal como se describe en el ejemplo 9. Fue necesaria una etapa de purificación extra en Superdex 75 para la eliminación de cierto producto de degradación monovalente (5-10%).

Ejemplo 27: Funcionalidad de ambos VHH en el constructo biespecífico

Se recubrió una placa de microtitulación con albúmina sérica de ratón 5 µg/ml durante la noche a 4°C. Tras lavar la placa, se bloquearon los pocillos durante 2 horas con PBS-caseína al 1%. Se permitió que las proteínas biespecíficas se unieran a los pocillos durante 2 horas a TA. Tras lavado, se añadió plasma humano, de perro y de cerdo a diferentes diluciones y se permitió que se uniera durante 2 horas a TA. Se detectó la unión de vWF con anticuerpo anti-vWF-HRP de DAKO a una dilución 1/3000. Se realizó la tinción con ABTS/H₂O₂. En la figura 14 se muestran los resultados e indican que la funcionalidad de ambos VHH se conserva en el constructo biespecífico.

Ejemplo 28: Inhibición de la unión de vWF a colágeno mediante los constructos biespecíficos en comparación con los VHH monovalentes

Se sometió a prueba la inhibición para la unión de vWF a colágeno para constructos monovalentes en comparación con constructos biespecíficos tal como se describe en el ejemplo 20. En la tabla 11 se resumen los valores de CI50. Los resultados indican que las propiedades inhibitoras de VHH se conservan en el constructo biespecífico.

Ejemplo 29: Construcción de un constructo biespecífico que contenía un fragmento de VHH-CDR3 fusionado a un VHH anti-albúmina sérica

Se amplificó una parte funcional, la región CDR3 de MP2F6SR, usando un cebador sentido ubicado en la región de entramado 4 (cebador directo de CDR3 de F6:CTGGCCCCAGAAGTCATACC) y un cebador antisentido ubicado en la región de entramado 3 (cebador inverso de CDR3 de F6:TGTGCATGTGCAGCAAACC).

Para fusionar el fragmento de CDR-3 con el VHH anti-albúmina sérica MSA-21, se realizó una segunda tanda de amplificación por PCR con los siguientes cebadores:

Cebador inverso de CDR3 de F6 de Sfi1: GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCTGTGCATGTGCAGCAAACC

Cebador directo de CDR3 de F6 de Not1: GTCCTCGCAACTGCGGCCGGCCTGGCCCCAGAAGTCATACC

Se realizaron las reacciones de PCR en 50 µl de volumen de reacción usando 50 pmol de cada cebador. Las condiciones de reacción para la PCR primaria fueron 11 min a 94°C, seguido por 30/60/120 s a 94/55/72°C durante 30 ciclos, y 5 min a 72°C. Se realizaron todas las reacciones con MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 200 mM y 1,25 U de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Roche Diagnostics, Bruselas, Bélgica).

Tras la escisión del gen de VHH de los clones de MSA con las enzimas de restricción Pst1/BstEII, se clonaron los productos digeridos en pAX11 para obtener clones con un VHH en el extremo C-terminal del sitio de clonación múltiple. Se examinaron los clones mediante PCR usando cebadores basados en vector. A partir de los clones que produjeron un producto de 650 pb, se preparó ADN y se usó como vector aceptor para clonar la CDR3 de MP2F6SR tras la escisión del producto de PCR con las enzimas de restricción Sfi1/Not1 para permitir la expresión N-terminal de CDR3 en fusión con un VHH de MSA.

Ejemplo 30: Cálculo de homologías entre anticuerpos de un solo dominio anti-diana de la invención

Se calculó el grado de homología de la secuencia de aminoácidos entre anticuerpos de un solo dominio anti-diana de la invención usando el editor de alineación de secuencias Bioedit. Los cálculos indican la proporción de residuos idénticos entre todas las secuencias cuando se alinean mediante ClustalW. (Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994.) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, presentado, junio de 1994). La tabla 12 indica la homología de fracción entre VHH anti-albúmina sérica de la invención. La tabla 13 indica la homología de fracción entre VHH anti-TNF-alfa de la invención. La tabla 14 indica la homología en porcentaje entre VHH anti-IFN-gamma de la invención. La tabla 15 indica la homología de fracción entre VHH anti-vWF de la invención.

ES 2 466 716 T3

Tabla 1: Esquema de inmunización según el ejemplo 1

Día de inmunización	HSA Llama 006
0	100 µg
7	100 µg
14	50 µg
21	50 µg
28	50 µg
35	50 µg

5 Tabla 2: Resultados tras una y dos tandas de cribado con albúmina sérica de ratón tal como se describe en el ejemplo 5.

	Primera tanda	Segunda tanda
Ufp de albúmina sérica de ratón	$2,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$
Ufp de caseína	5×10^5	$2,5 \times 10^5$
Enriquecimiento	5.000	10.000

10 Tabla 3: Se seleccionaron clones tras una y dos tandas de selección y se prepararon extractos periplasmáticos. Se analizaron estos clones en ELISA para determinar la unión a albúmina humana y de ratón tal como se describe en el ejemplo 6.

	Primera tanda	Segunda tanda
Albúmina sérica de ratón mediante ELISA	1/16	15/16
Albúmina sérica humana mediante ELISA	1/16	15/16
Caseína mediante ELISA	0/16	0/16

Tabla 4: Lista de secuencias

NOMBRE	SEQ ID	SECUENCIA
		Anticuerpo anti-albúmina sérica de ratón
MSA21	1	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVSEWVSGISS LGDSTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPPG QGTQVTVSS
MSA24	2	QVQLQESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRNFGMSWVRQAPGKEPEWVSSISG SGSNTIYADSVKDRFTISRDNKSTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSS QGTQVTVSS
MSA210	3	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSRFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISS

15

		DSGTKNYADSVKGRFTISRDNACKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGSPSSQ GTQVTVSS
MSA212	4	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISA DGS DKRYADSVKGRFTISRDNCKMLT'LDMNSLKPEDTAVYYCVIGRGSPASQ GTQVTVSS
MSAcl6	28	AVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCVVSCTTFSSAAMGWFRQAPGKEREFVGAIKW SGTSTYYTDSVKGRFTISRDNVKNVYVYLMNLSLKPEDTGVYTCADRDRYRDR MGPMTTDFRFWQGTQVTVSS
MSAcl1 2	29	QVKLEESGGGLVQVGGSLRLSCAASGRTFSSFAMGWFRQAPGREREFVASIGS SGITTYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLMNLSLKPEDTGLCYCAVNRVYGIPIYR SETQYQNWQGTQVTVSS
MSAcl1 0	30	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFNDYAMGWYRQAPGKERDMVATISI GGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYLMNLSLKPEDTAIYYCVAHRQTVVRGP YLLWGQGTQVTVSS
MSAcl1 4	31	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSNYAMGWFRQAPGKEREFVAGSGR SNSYNYYSDSVKGRFTISRDNKNTVYVYLMNLSLKPEDTAVYYCAASTNLWPRD RNLYAYWGQGTQVTVSS
MSAcl1 6	32	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSLGIYRMGWFRQVPGKEREFVAAISW SGGTTRYLDSVKGRFTISRSTKNAVYVYLMNLSLKPEDTAVYYCAVDSSGRLYW TLSTSYDYWGQGTQVTVSS
MSAcl1 9	33	QVQLVEFEGGLVQAGDSLRLSCAASGRSLGIYKMAWFRQVPGKEREFVAAISW SGGTTRYIDSVKGRFTLSRDNTKNMVYVYLMNLSLKPDDTAVYYCAVDSSGRLYW TLSTSYDYWGQGTQVTVSS
MSAcl5	34	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSPYTMGWFRQAPGKEREFVAVT SGSSTFYGDSVKGRFTASRDSAKNTVTLNLSLNPEDTAVYYCAAAYGGGLYR DPRSVDYWGRTQVTVSS
MScl11	35	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDANPIAWFRQAPGKEREGVSCIRD GTTYADSVKGRFTISSDNANNTVYVYVQNTSLKPEDTAVYYCAAPSGPATGSSH TFGIYWNLRDDYDNWGQGTQVTVSS
MSAcl1 5	36	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDHYTIGWFRQVPGKEREGVSCISS SDGSTYYADSVKGRFTISSDNKNTVYVYVQNTLEPDDTAVYYCAAGGLLLRVE ELQASDYDYWGQGIQVTVSS
MSAcl8	37	AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTLDYVAIGWFRQAPGKEREGVACISN SDGSTYYGDSVKGRFTISRDNKNTVYVYVQNTLEPDDTAVYYCATADRHYAS HHPFADFANSWGQGTQVTVSS
MSAcl7	38	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAYGLTFWRAAMAWFRAPGKERELVARNW GDGSTRYADSVKGRFTISRDNKNTVYVYVQNTLEPDDTAVYYCAAVRTYGSAT YDIWGQGTQVTVSS
MSAcl2 0	39	EVQLVESGGGLVQDGGSLRLSCIFSGRTFANYAMGWFRQAPGKEREFVAAINR NGGTTNYADALKGRFTISRDNKNTVYVYVQNTLEPDDTAVYYCAAREWPFSTI PSGWRYWGQGTQVTVSS
MSAcl4	40	DVQLVESGGGWVQPGGSLRLSCAASGPTASSHAIGWFRQAPGKEREFVVGINR GGVTRDYADSVKGRFAVSRDNVKNVYVYVQNTLEPDDTAVYYCAARPEYSPTA MSKGDMDYWGKGLVTVSS
		Anticuerpo anti-albúmina sérica de ratón/anticuerpo anti-TNF-alfa
MSA21/ VHH#3E	5	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVWVSGISS LGDSTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYVYVQNTLEPDDTAVYYCTIGGSLNPGG QGTQVTVSSEPKTPKQPAQAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYT YTIWFRQAPGKEREFVARIYWSGNTYYADSVKGRFAISRDIKNTVDLTMNNLEPE

		DTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
MSA24/ VHH#3E	6	QVQLQESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFRNFGMSWVRQAPGKEPEWVSSISG SGSNTIYADSVKDRFTISRDNASTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSS QGTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTPSDHSGYT YTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIKNTVDLTMNLEPE DTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
MSA210 / VHH#3E	7	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISS DSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKMLFLQMNLSLRPEDTAVYYCVIGRGSPPSSQ GTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTPSDHSGYTY TIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIKNTVDLTMNLEPED TAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
MSA212 / VHH#3E	8	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISA DGS DKRYADSVKGRFTISRDNKMLTLDMNLSLKPEDTAVYYCVIGRGS PASQ GTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTPSDHSGYTY TIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIKNTVDLTMNLEPED TAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
MSA21/ MSA21/ VHH#3E	9	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVWVSGISS LGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPGG QGTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRF GMTWVRQAPGKGVWVSGISS LGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLS LKPEDTAVYYCTIGGSLNPGGQGTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGL VQPGGSLRLS CAASGRTPSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTY YADSVKGRFAISRDIKNTVDLTMNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYN YWGQGTQVTVSS
MSA210 / VHH#1	10	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISS DSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKMLFLQMNLSLRPEDTAVYYCVIGRGSPPSSQ GTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CATSGFDFSVSW MYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMDSL IPEDTALYICARSPSGSFRGQGTQVTVSS
MSA210 / VHH#9	11	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISS DSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKMLFLQMNLSLRPEDTAVYYCVIGRGSPPSSQ GTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGSI FRVNA MGWYRQVPGNQREFVAIITSGDNLNYADAVKGRFTISTDNVKKTVYLQMNVLK PEDTAVYYCNAILQTSRWSIPSNYWGQGTQVTVSS
MSA210 / VHH#1 3	12	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISS DSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKMLFLQMNLSLRPEDTAVYYCVIGRGSPPSSQ GTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CATSGFTFSDYW MYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSL KSEDTAVYYCTKVVPYSDSRTNADWGQGTQVTVSS
MSA210 / VHH#2	13	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISS DSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKMLFLQMNLSLRPEDTAVYYCVIGRGSPPSSQ GTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTPSDHS GYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIKNTVDL TMNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
MSA210 / VHH#3	14	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAISS DSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKMLFLQMNLSLRPEDTAVYYCVIGRGSPPSSQ GTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRTPSAHS VYTMGFRQAPGKEREFVARIYWSSANTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLLM NSLKPEDTAVYYCAARDGIPTSRVGSYNYWGQGTQVTVSS
MSA21/ VHH#12	15	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVWVSGISS LGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPGG

B		QGTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENH WMYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNKYTLYLQMN LKSEDTAVYYCTKVLPPYSDDSRNADWGQGTQVTVSS
MSA24/ VHH#12 B	16	QVQLQESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRNFGMSWVRQAPGKEPEWVSSI SGSNTIYADSVKDRFTISRDNASTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTIGGSLRS S QGTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF EFENH WMYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDN KYTLYLQMN LKSEDTAVYYCTKVLPPYSDDSRNADWGQGTQVTVSS
MSA210 /VHE#1 2B	17	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SAISS DSGTKNYADSVKGRFTISRDNKMLFLQMNLSLRPEDTAVYYC VIGRGSPPSSQ GTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQPGG SLRLSCAASGF EFENHW MYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYAD SVKGRFTISRDNKYTLYLQMN LKSEDTAVYYCTKVLPPYSDDSRN ADWGQGTQVTVSS
MSA212 /VHH#1 2B	18	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLEWV SAISA DGSDKRYADSVKGRFTISRDNKMLTLDMNSLKPEDTAVYYC VIGRGSPPASQ GTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQPGG SLRLSCAASGF EFENHW MYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYAD SVKGRFTISRDNKYTLYLQMN LKSEDTAVYYCTKVLPPYSDDSRN ADWGQGTQVTVSS

		Anticuerpo anti-albúmina sérica de ratón/anticuerpo anti-vWF
MSA21/A M-2-75	19	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGV EWSGIS SLGDSSTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTAV YYCTIGGSLNPG GQGTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF NFN WYPMSWVRQAPGKGLEWVSTISTYGEPR YADSVKADSPSETPTTRCICNE QPETEDTAVYYCARGAGTSSYL PQRGNWDQGTQVTVSS
MSA21/A M-4-15-3	20	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGV EWSGIS SLGDSSTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTAV YYCTIGGSLNPG GQGTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQDSGGGLVQ PGGSLRLACAASGSI FS INSMGWYRQAPGKQRELVAHALADGSAS YRDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNTVPSV TKGYWGQGTQVTVSS
MSA21/2 2-4L-16	21	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGV EWSGIS SLGDSSTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTAV YYCTIGGSLNPG GQGTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGRTPS SYAMGWFRQAPGKEREVFAAISWSSG STYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCVADT GGISWIRTQGYNYWGQGTQVTVSS
		Anticuerpo anti-albúmina sérica de ratón/anticuerpo anti-IgE
MSA 21/ EV 2H11	22	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGV EWSGISLGDSTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTAV YYCTIGGSLNPGGQGTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGVTFSSYAMGWFRQAPGKEREVFAISITWTGT GTYA DSVKGRFTISRDHAGTTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAVDR RSSTYYLM KGEYDYRGRGTQVTVSS
MSA 24/ Ev 2H11	23	QVQLQESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRNFGMSWVRQAPGKEPE WVSSI SSGSNTIYADSVKDRFTISRDNASTLYLQMNLSLKPEDTAV YYCTIGGSLRS SSGGTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGVTFSSYAMGWFRQAPGKEREVFAISITWTGT GTYA DSVKGRFTISRDHAGTTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAVDR RSSTYYLM KGEYDYRGRGTQVTVSS
MSA 210/ EV 2H11	24	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSAISS DSGTKNYADSVKGRFTISRDNKMLFLQMNLSLRPEDTAV YYCVIGRGSPPSSQGTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGVTFSSYAMGWFRQAPGKEREVFAISITWTGT GTYAD SVKGRFTISRDHAGTTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCAVDR RSSTYYLM KGEYDYRGRGTQVTVSS

		Anticuerpo anti-albúmina sérica de ratón/anticuerpo anti-IFN-gamma
--	--	--

MSA 21/ MP2F6SR	25	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGV VSGISSLDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLSLKPEDTAVY YCTIGGSLNPGGQGTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVKLEESGGGLVQA GGSLRLSCAASGRTFNINMGWFRQAPGKEREFVAIISWNGGSTYYD DSVKGRFTISRDNANLVYLQMNLSLNFEDTAVYYCACAAANPYGIPQY RENRYDFWGQGTQVTVSS
MSA 24/ MP2F1BR	26	QVQLQESGGGLVQPGNSLRLSCEASGFTFRNFGMSWVRQAPGKEPEW VSSISGSGSNTIYADSVKDRFTISRDNASTLYLQMNLSLKPEDTAVY YCTIGGSLSRSSQGTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLVESGGGLVQV GDSLRLSCVASGGTFSRYAMGWFRQAPGKEREFVARIGYSGRSISYA TSVEGRFAISRDNAKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCASLVSGTLYQAD YWGQGTQVTVSS
MSA 210/ MP3H6SR A	27	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSAISSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKMLFLQMNLSLRPEDTAVY YCVIGRGSPPSSQGTQVTVSSEPKTPKQPAAAQVQLQESGGGLVQAG GSLRLSCAASGRTFIYNMGWFRQAPGKEREFVAGISWNGGSIYYTS SVEGRFTISRDAENTVYLQMNLSLKPEDTGVYYCASKGRPYGVPSPR QGDYDYWGQGT QVTVSS

Tabla 5: Afinidades (koff, kon y KD) para agentes de unión a albúmina tal como se determina mediante BIACORE tal como se describe en el ejemplo 13.

5

	K _{on} (10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹)	K _{off} (10 ⁻⁵ s ⁻¹)	K _D [nM]
MSA21	3,4	420	12
MSA24	6,4	1800	28
MSA212	3,	9330	250
MSA21/TNF3E	2,3	370	16
MSA24/TNF3E	3,1	630	20
MSA212/TNF3E	0,42	490	120

Tabla 6: Resultados para el ensayo de LAL para nanocuerpos monovalentes y biespecíficos tras purificación en polimixina tal como se describe en el ejemplo 15.

	TNF3E monovalente	MSA21/TNF3E biespecífico	MSA24/TNF3E biespecífico
Unidades de endotoxina/mg de VHH	0,13 UE/mg	0,75 UE/mg	2,8 UE/mg

10

Tabla 7: Esquema de inmunización usado para llama 002 según el ejemplo 17.

Llama 002 Día de inmunización	vWF
0	100 µg
7	100 µg
14	50 µg
21	50 µg
28	50 µg
35	50 µg

Tabla 8: Unidades formadoras de placas (ufp) tras una o dos tandas de cribado con vWF en comparación con PBS-caseína tal como se describe en el ejemplo 19. Ufp de vWF (antígeno) dividido entre ufp de caseína (una unión específica) = enriquecimiento.

15

Tanda	Ufp de vWF	Ufp de caseína	Enriquecimiento
Primera	1 x 10 ⁷	2,5 x 10 ⁹	40
Segunda	5 x 10 ⁸	2,5 x 10 ⁹	200

Tabla 9: Número de inhibidores frente a el número de clones sometidos a prueba tras la primera y la segunda tandas de cribado tal como se describe en el ejemplo 20.

Tanda	Número de inhibidores frente a número de clones sometidos a prueba
Primera	4/800
Segunda	4/96

5 Tabla 10: concentración de VHH (nM) necesaria para inhibir la unión de vWF a colágeno en el 50% (CI50) tal como se describe en el ejemplo 23.

Nombre VHH	CI50 (nM)
22-2L-34	10
T76	30
A-4-15-3	2
22-4L-16	0,5
C37	2
AM-2-75	2

10 Tabla 11: Valores de CI50 para nanocuerpos biespecíficos contra albúmina y contra vWF tal como se describe en el ejemplo 28.

	CI50 (nM)
AM-2-75	100
MSA21/AM-2-75	60
AM-4-15-3	155
MSA21/AM-4-15-3	245
22-4L-16	100
MSA21/22-4L-16	140

15 Tabla 12: Homologías fraccionadas entre las secuencias de aminoácidos de VHH anti-albúmina sérica de ratón de la invención.

SEQ	MSA21	MSA24	MSA210	MSA212
MSA21	1,000	0,834	0,800	0,782
MSA24	---	1,000	0,782	0,791
MSA210	---	---	1,000	0,903
MSA212	---	---	---	1,000

Tabla 13: Homologías fraccionadas entre VHH anti-TNF-alfa de la invención

SEQ	VHH#1A	VHH#7B	VHH#2B	VHH#3E	VHH#3G	VHH#10A	VHH#2G	VHH#1F	VHH#9C	VHH#11E	VHH#10C	VHH#4B	VHH#10D	VHH#12B	VHH#9E	VHH#3F
VHH#1A	1,000	0,601	0,764	0,596	0,622	0,600	0,682	0,629	0,609	0,601	0,614	0,818	0,642	0,747	0,596	0,604
VHH#7B	---	1,000	0,604	0,635	0,645	0,943	0,653	0,616	0,933	0,933	0,719	0,593	0,614	0,620	0,616	0,624
VHH#2B	---	---	1,000	0,620	0,645	0,611	0,682	0,661	0,629	0,620	0,637	0,796	0,634	0,951	0,620	0,645
VHH#3E	---	---	---	1,000	0,875	0,641	0,713	0,689	0,620	0,643	0,612	0,604	0,648	0,596	0,674	0,682
VHH#3G	---	---	---	---	1,000	0,651	0,779	0,740	0,637	0,637	0,653	0,645	0,689	0,622	0,708	0,716
VHH#10A	---	---	---	---	---	1,000	0,658	0,614	0,935	0,935	0,725	0,592	0,612	0,626	0,622	0,637
VHH#2G	---	---	---	---	---	---	1,000	0,741	0,653	0,669	0,685	0,666	0,746	0,650	0,701	0,717
VHH#1F	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,616	0,616	0,664	0,661	0,714	0,645	0,709	0,717
VHH#9C	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,941	0,743	0,601	0,622	0,645	0,600	0,616
VHH#11E	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,719	0,601	0,622	0,637	0,608	0,624
VHH#10C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,650	0,606	0,637	0,600	0,632
VHH#4B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,611	0,796	0,588	0,629
VHH#10D	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,619	0,674	0,674
VHH#12B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,604	0,637
VHH#9E	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,854
VHH#3F																1,000

ES 2 466 716 T3

Tabla 15: Homologías fraccionadas entre VHH anti-vWF de la invención.

SEQ	C37	C37-hum	AM-2-75	22-2L-34	22-4L-16	T76	AM-4-15-3	A50	I53	Z29	M53	2A1-4L-79	2A1-4L-129	2A1-4L-34	2A1-4L-78	2LA1-15	3P1-31	3L-41	3P2-31	C37-3	C37-4	C37-8	C37-10
C37	1,00	0,95	0,99	0,59	0,68	0,63	0,63	0,65	0,59	0,57	0,59	0,57	0,61	0,59	0,62	0,61	0,66	0,63	0,60	0,97	0,96	0,93	0,91
C37-hum	---	1,00	0,94	0,59	0,68	0,63	0,63	0,65	0,58	0,57	0,60	0,59	0,61	0,60	0,62	0,62	0,66	0,63	0,59	0,97	0,98	0,98	0,96
AM-2-75	---	---	1,00	0,60	0,68	0,64	0,64	0,66	0,59	0,57	0,60	0,58	0,62	0,60	0,62	0,62	0,67	0,64	0,60	0,96	0,95	0,92	0,92
22-2L-34	---	---	---	1,00	0,77	0,61	0,64	0,71	0,66	0,64	0,64	0,67	0,70	0,70	0,65	0,65	0,66	0,63	0,63	0,59	0,59	0,58	0,58
22-4L-16	---	---	---	---	1,00	0,71	0,70	0,80	0,70	0,73	0,69	0,70	0,73	0,72	0,70	0,68	0,73	0,69	0,71	0,67	0,67	0,68	0,68
T76	---	---	---	---	---	1,00	0,77	0,68	0,59	0,62	0,61	0,61	0,62	0,61	0,65	0,60	0,69	0,65	0,65	0,62	0,62	0,61	0,61
AM-4-15-3	---	---	---	---	---	---	1,00	0,66	0,65	0,61	0,62	0,63	0,65	0,65	0,62	0,67	0,69	0,68	0,62	0,63	0,63	0,62	0,62
A50	---	---	---	---	---	---	---	1,00	0,67	0,70	0,66	0,67	0,70	0,67	0,68	0,68	0,69	0,67	0,69	0,64	0,64	0,64	0,64
I53	---	---	---	---	---	---	---	---	1,00	0,63	0,69	0,70	0,72	0,72	0,64	0,65	0,66	0,65	0,63	0,58	0,58	0,56	0,56
Z29	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,00	0,64	0,64	0,67	0,68	0,71	0,64	0,63	0,61	0,66	0,56	0,56	0,56	0,56
M53	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,00	0,70	0,70	0,72	0,67	0,60	0,64	0,64	0,69	0,59	0,59	0,58	0,60
2A1-4L-79	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,00	0,88	0,85	0,66	0,63	0,64	0,62	0,62	0,57	0,57	0,57	0,57
2A1-4L-129	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,00	0,88	0,70	0,65	0,67	0,64	0,64	0,61	0,61	0,60	0,60
2A1-4L-34	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,00	0,66	0,64	0,65	0,64	0,62	0,58	0,58	0,58	0,58
2A1-4L-78	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,00	0,63	0,65	0,62	0,70	0,62	0,62	0,60	0,60
2LA1-15	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,00	0,65	0,62	0,60	0,60	0,61	0,60	0,60
3P1-31	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,00	0,89	0,67	0,65	0,65	0,64	0,64
3L-41	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,00	0,65	0,63	0,63	0,62	0,62
3P2-31	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,00	0,58	0,58	0,57	0,57
C37-3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,00	0,99	0,95	0,94
C37-4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,00	0,96	0,95
C37-8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,00	0,98
C37-10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,00

REIVINDICACIONES

1. Constructo polipeptídico que comprende:
- 5 - al menos un anticuerpo de un solo dominio dirigido contra una diana terapéutica y/o de diagnóstico, y
- al menos un anticuerpo de un solo dominio dirigido contra albúmina sérica humana, que es
- 10 a) SEQ ID NO: 1, o
- b) un anticuerpo VHH de *Camelidae* humanizado que es una secuencia homóloga que presenta una identidad de secuencia de más del 90% con una secuencia representada por SEQ ID NO: 1, y que da reacción cruzada entre albúmina sérica de cerdo, humana, de ratón, de hámster y de conejo.
- 15 2. Constructo polipeptídico según la reivindicación 1, en el que:
- el número de anticuerpos de un solo dominio anti-diana es de al menos dos, y
- 20 - al menos dos anticuerpos de un solo dominio anti-diana no comparten la misma secuencia, o todos los anticuerpos de un solo dominio anti-diana comparten la misma secuencia.
3. Constructo polipeptídico según la reivindicación 1 ó 2, en el que el al menos un anticuerpo de un solo dominio que es un anticuerpo VHH de *Camelidae* humanizado y que es una secuencia homóloga que presenta una identidad de secuencia de más del 90% con una secuencia representada por SEQ ID NO: 1 puede unirse a su diana con una afinidad mejor que 10^{-6} M.
- 25 4. Constructo polipeptídico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que una diana es TNF-alfa.
5. Constructo polipeptídico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que una diana es vWF.
- 30 6. Ácido nucleico que codifica para un constructo polipeptídico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

Figura 1

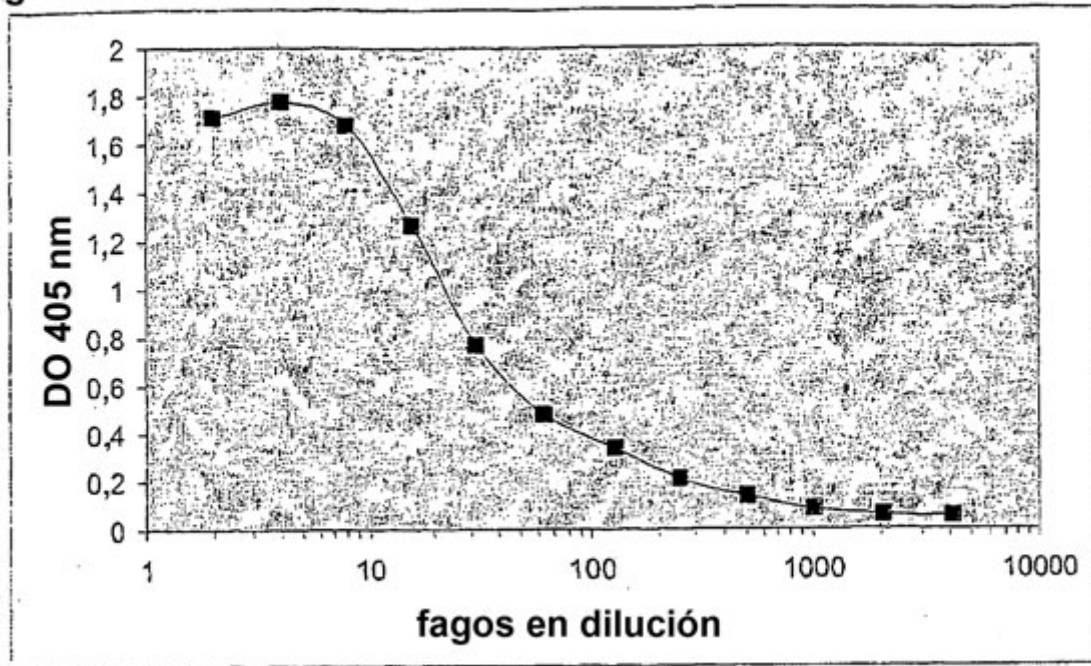


Figura 2

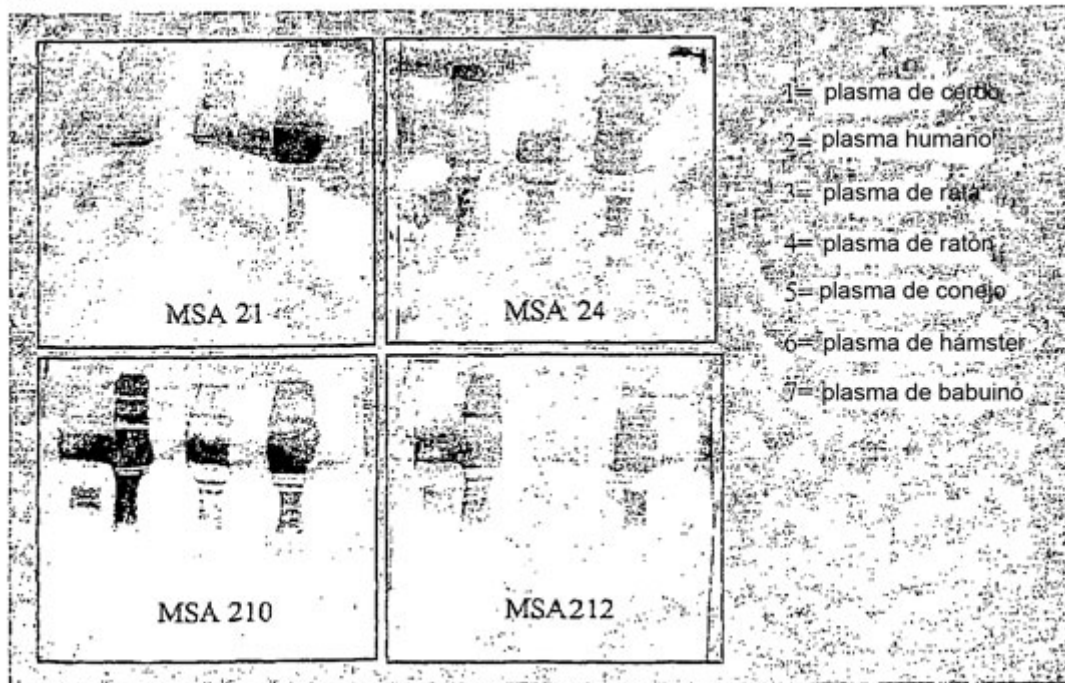


Figura 3

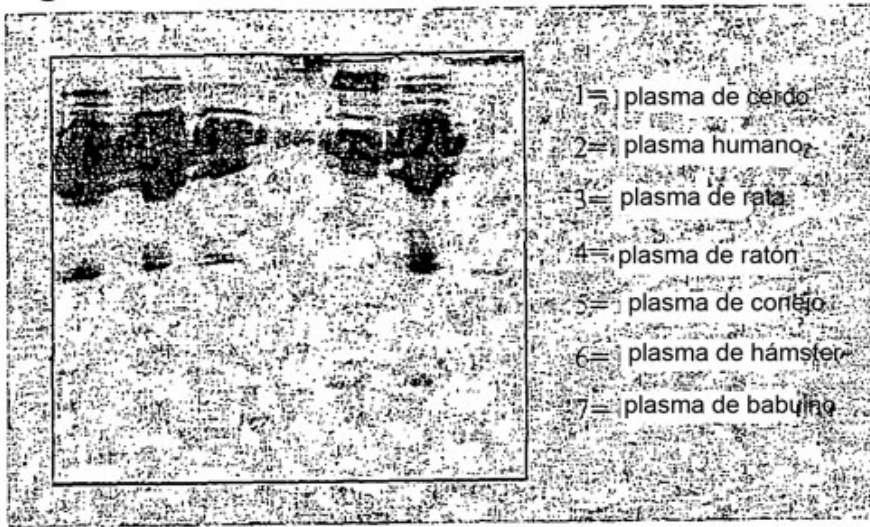


Figura 4

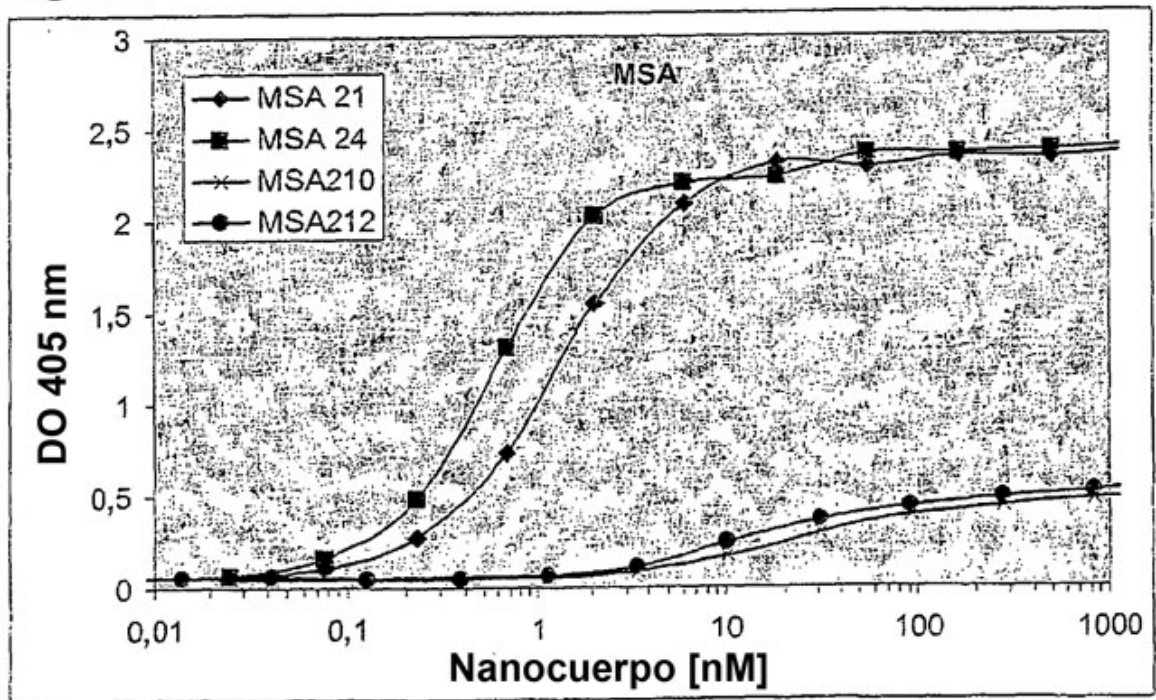


Figura 5

```

HindIII
1  aagcttgcgat gcaaattcota tttcaaggag acagtcataa tgaatacct attgcctacg gcagccgctg gattgttatt
                                     M K Y L L P T A A A G L L L
                                     <
                                     pe1B-secuencia líder

SfiI   NcoI           NotI           PstI
81  actcggggcc cagccgggcca tggggcctaa tagggggcgg cacaggtgca getgcaggag tcataatgag ggacccaggt
   L A A Q P A M G P - - A A A Q V Q L Q E S - - G T Q V
   Secuencia líder >< VHH#1 > < VHH#2

BstEII
161 caccgtctcc tcagaacaaa aactcatctc agaagaggat ctgaatgggg ccgcacatca tcataatgat cattaatgag
   T V S S E Q K L I S E E D L N G A A H H H H H - -
   >< C-MYC > > < His6 >

ScoRI
241 aattcactgg ccg
    
```

Figura 6

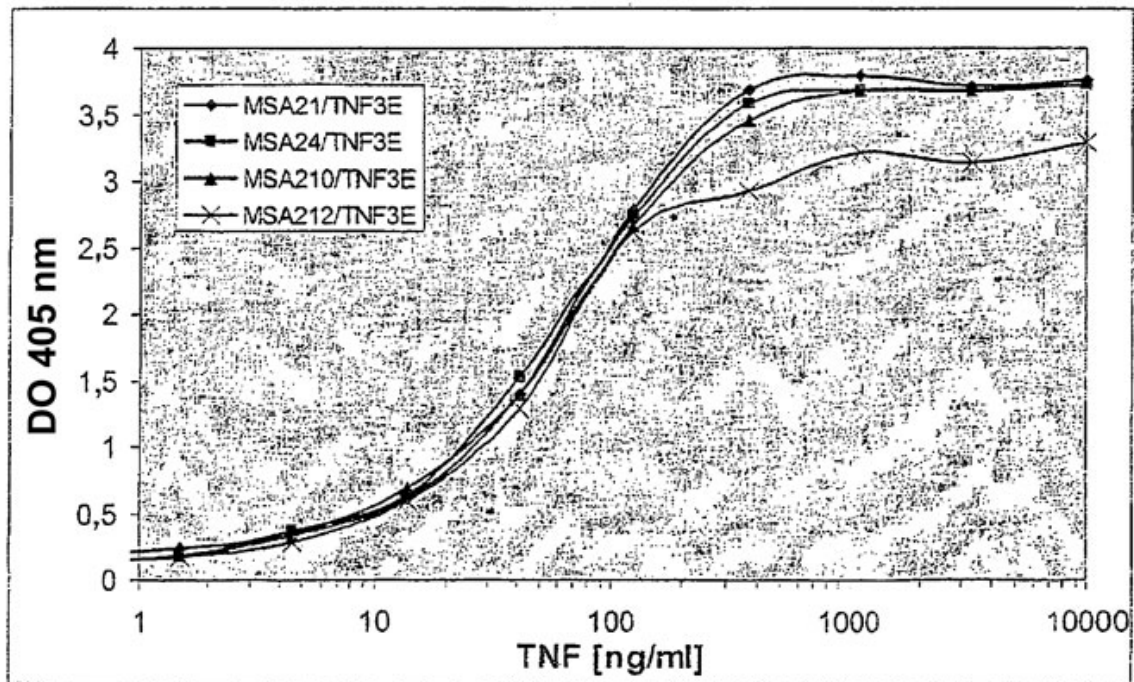


Figura 7

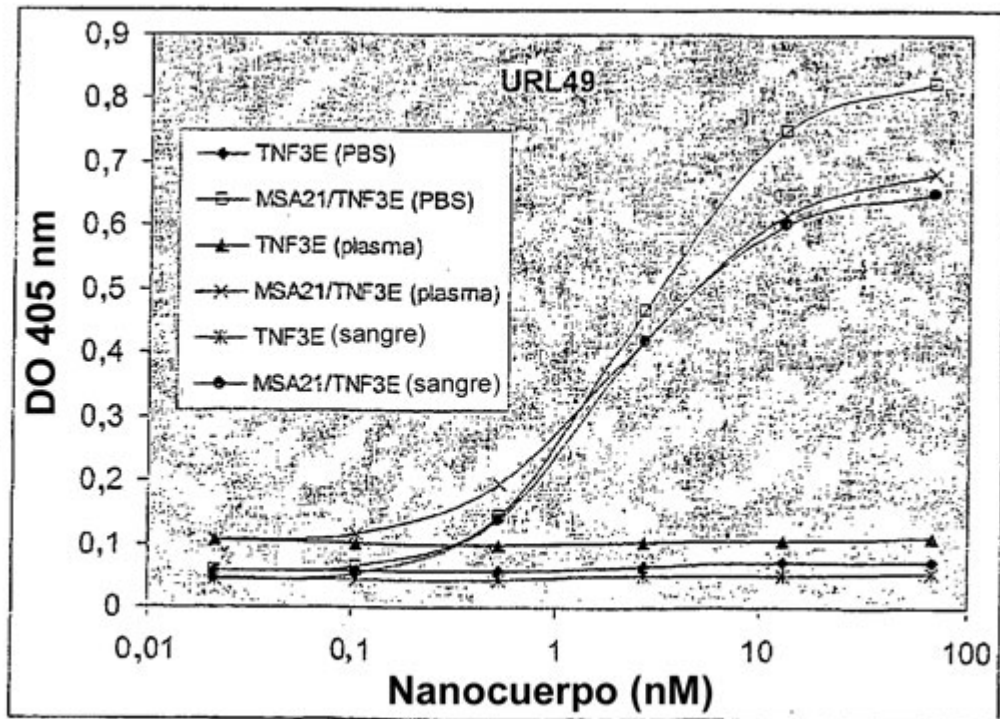
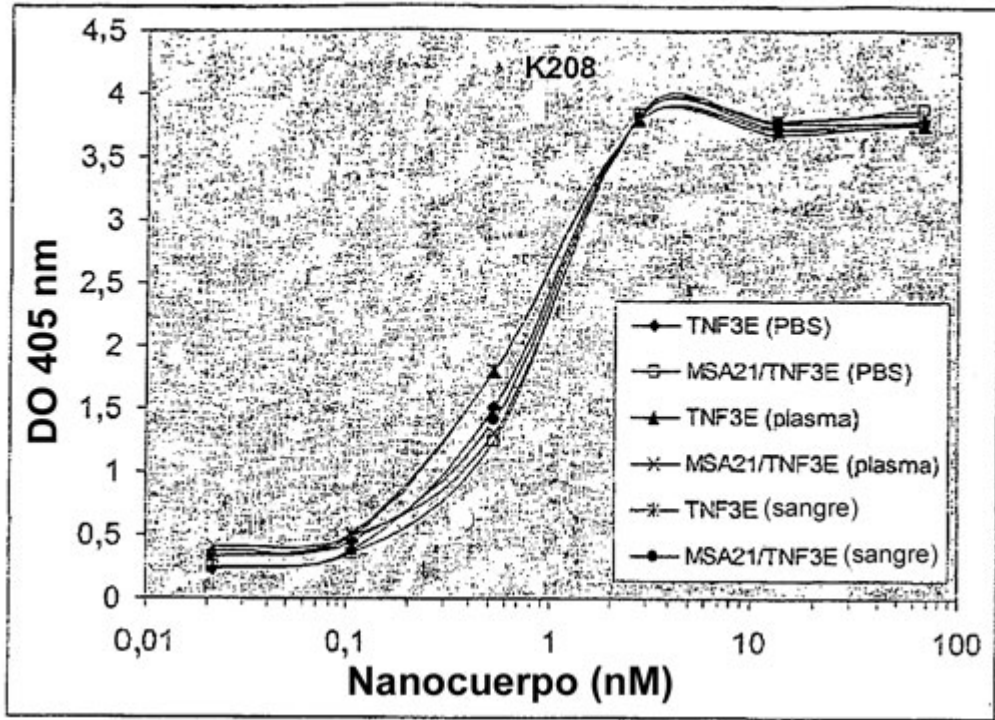


Figura 8

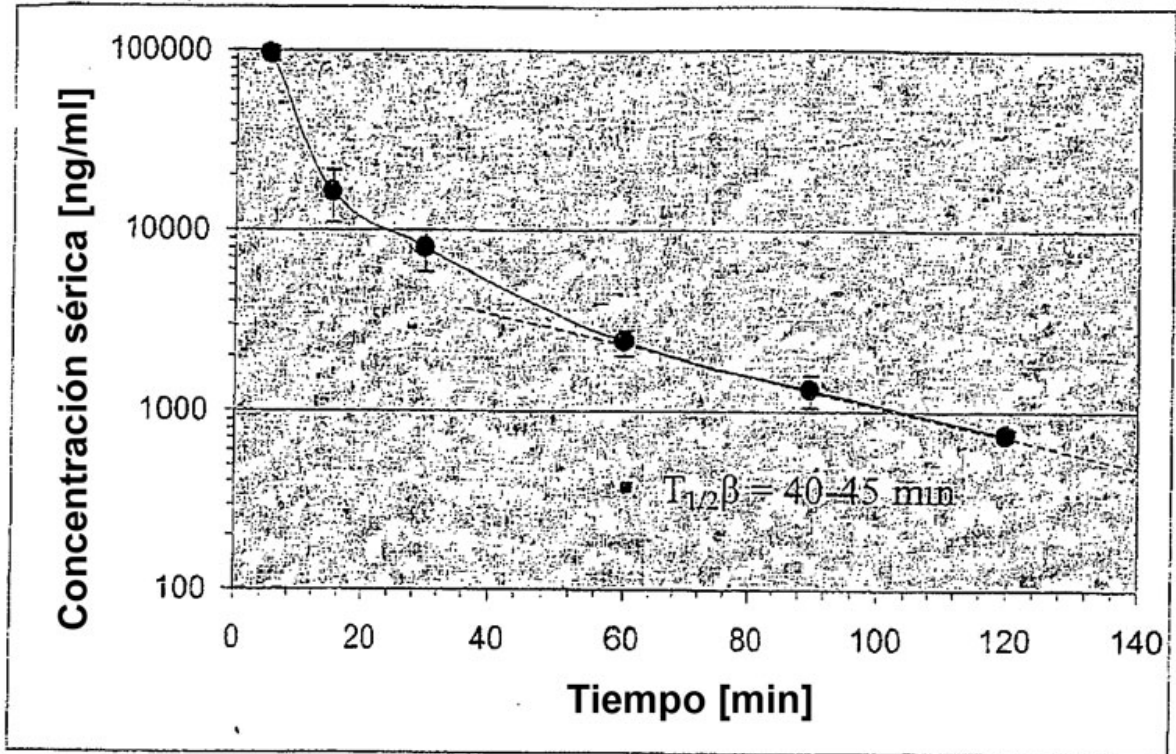


Figura 9

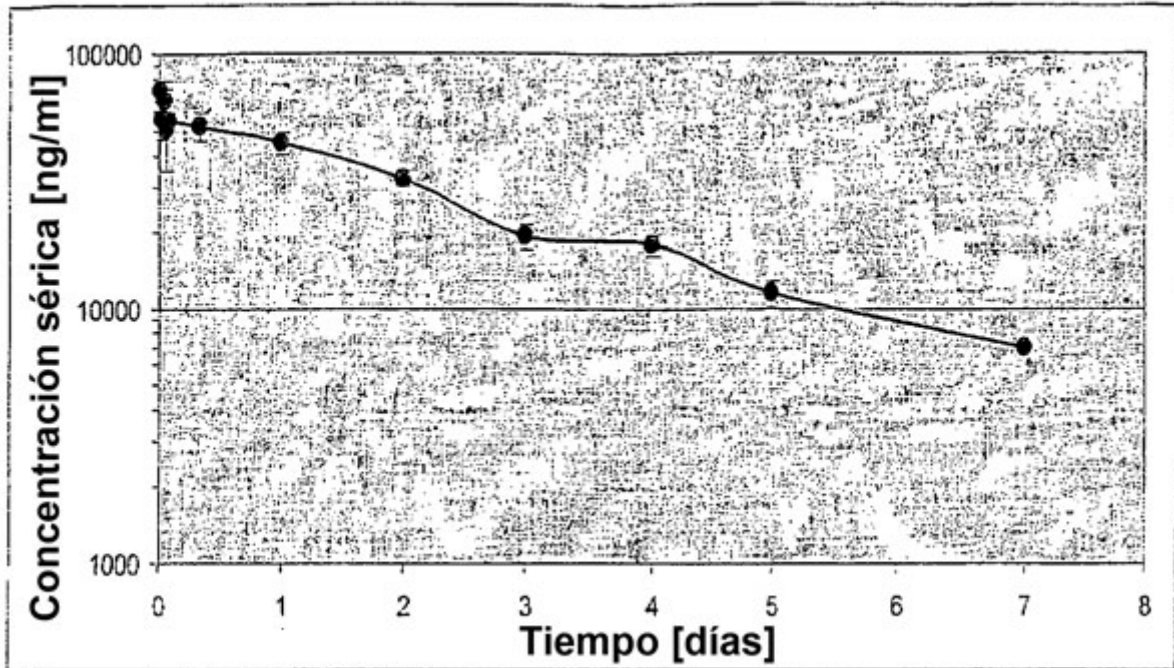


Figura 10

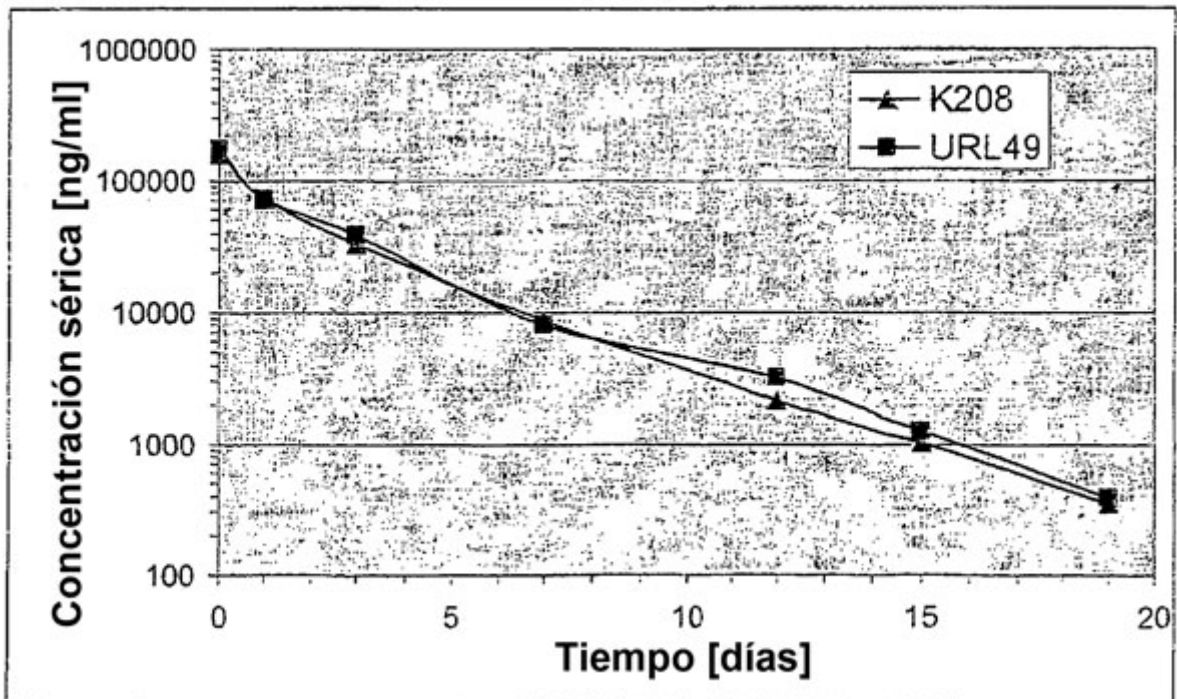


Figura 11

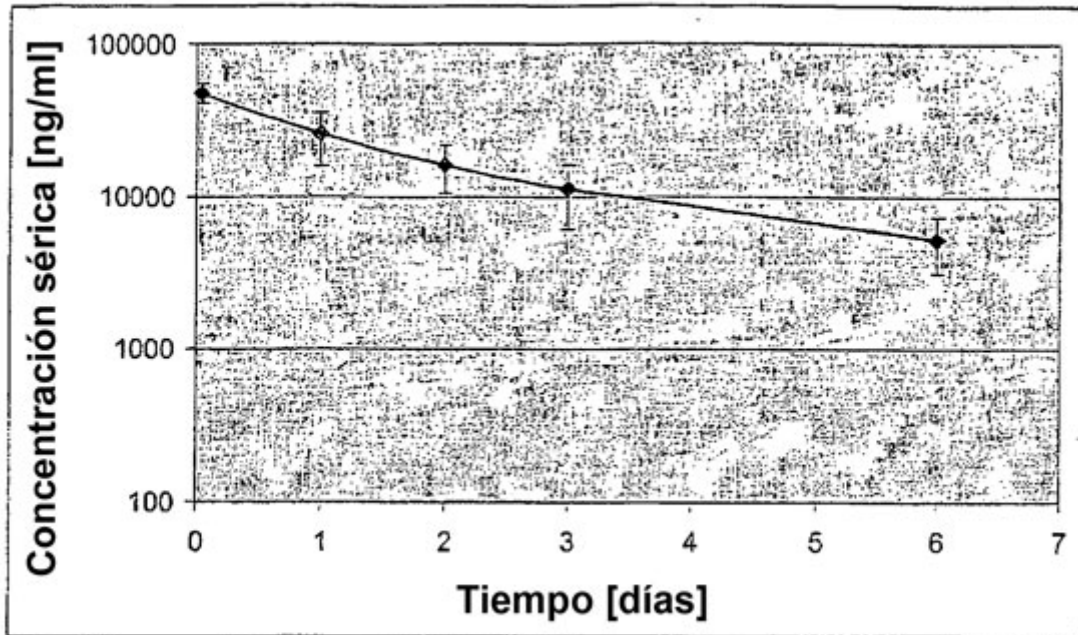


Figura 12

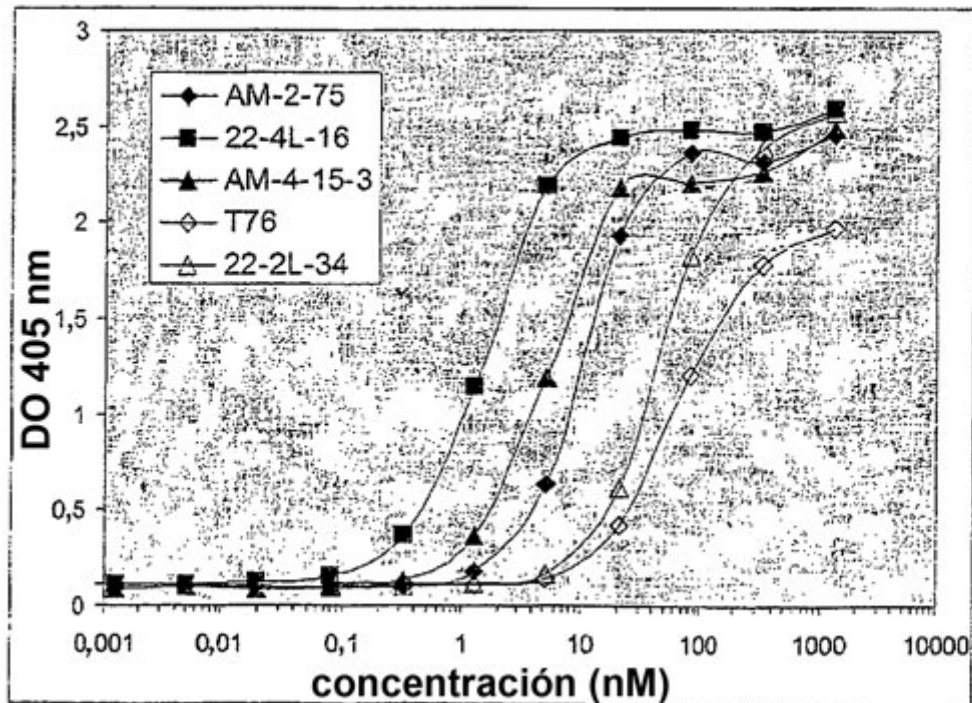


Figura 13

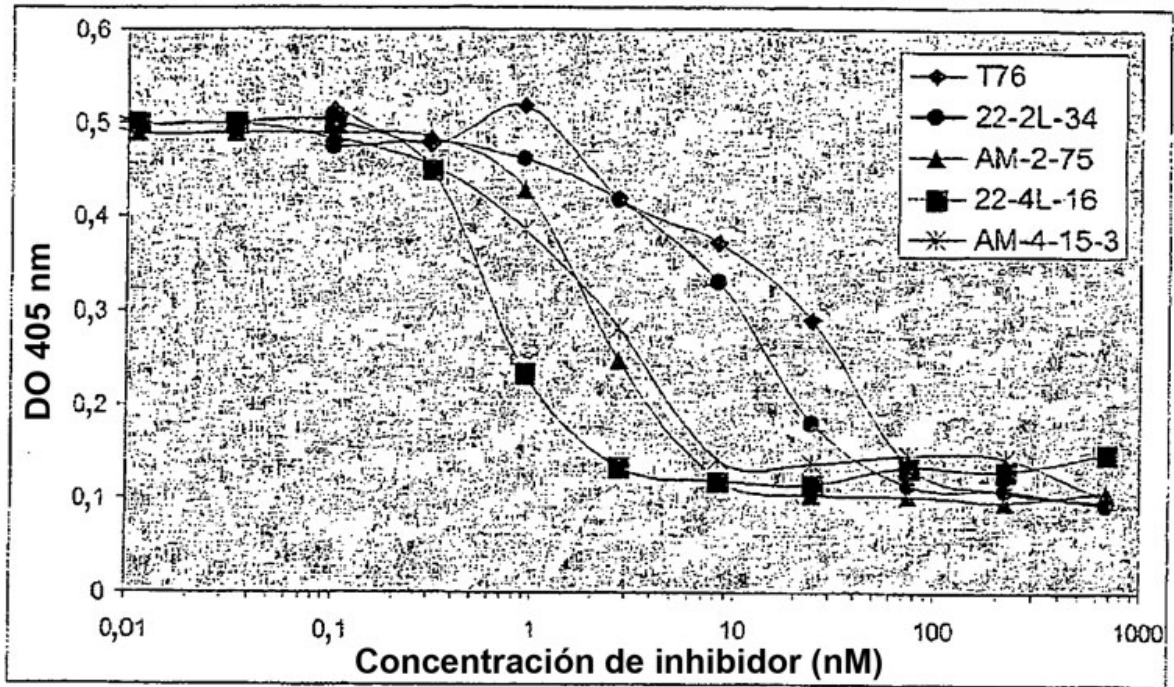


Figura 14

